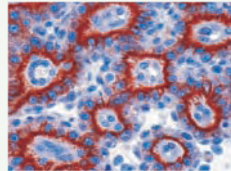
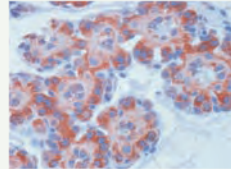


EXPRESSION ZYTOSKELETALER FILAMENTE UND DES VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) SYSTEMS IN DER ENDOTHELIOCHORIALEN PLAZENTA VON HUND UND KATZE

LINN BEZLER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet. beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Betreuer: Prof. Dr. C. Pfarrer

Expression zytoskeletaler Filamente und des vascular endothelial growth factor (VEGF) systems in der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades

eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Linn Bezler

Tierärztin aus Koblenz

Gießen 2008

Gefördert durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. C. Pfarrer
Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

Tag der Disputation: 22.02.2008

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT	7
1.1	GRUNDLAGEN DER PLAZENTATION BEIM FLEISCHFRESSER	7
1.2	DAS ZYTOSKELETT	15
1.2.1	<i>Mikrofilamente</i>	15
1.2.2	<i>Intermediärfilamente</i>	17
1.3	ANGIOGENESE IN DER PLAZENTA	21
1.3.1	<i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i>	25
1.3.2	<i>VEGF-Rezeptor-1 und VEGF-Rezeptor-2</i>	30
1.3.3	<i>Bedeutung des vascular endothelial growth factor (VEGF) für die plazentare Angiogenese</i>	39
1.4	ZIELSETZUNG DER STUDIE	41
2	MATERIAL UND METHODEN	42
2.1	MATERIAL	42
2.1.1	<i>Entnahme und Präparation der Proben</i>	46
2.2	METHODEN	47
2.2.1	<i>Immunhistochemische Untersuchungen</i>	47
2.2.1.1	Vorbemerkungen	47
2.2.1.2	Verwendete Antikörper	47
2.2.1.3	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)-Methode	48
2.2.1.4	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode	48
2.2.1.5	ImmPRESS™ Detection System (Anti-Mouse Ig Peroxidase) von Linaris	49
2.2.1.6	Immunhistochemische Protokolle zum Nachweis von Aktin, Zytokeratin und Vimentin	50
2.2.1.7	Immunhistochemische Protokolle zum Nachweis von VEGF und dessen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2	52
2.2.1.8	Lichtmikroskopische Auswertung der Immunhistologie	57
2.2.2	<i>Gelelektrophorese und Western Blot mit NuPAGE® von Invitrogen</i>	57
2.2.2.1	Allgemeine Grundlagen	57
2.2.2.2	Verwendete Antikörper und Positivkontrollen	58
2.2.2.3	Vorbemerkungen	58
2.2.2.4	Protokoll für Protein-Extraktion aus Kryomaterial (TRIzol® Reagenz)	59
2.2.2.5	Protokoll für Protein-Extraktion aus Kryomaterial mit Boehringer Lyse Puffer (BLP)	61
2.2.2.6	Protokoll Gelelektrophorese und Western Blot mit NuPAGE® und WesternBreeze® Chromogenic Immunodetection System	62
2.2.2.7	Dokumentation	65
2.2.3	<i>Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)</i>	66
2.2.3.1	Allgemeine Grundlagen	66
2.2.3.2	Extraktion der Gesamt-RNA aus Gefriermaterial	66
2.2.3.3	Protokoll für RNA-Extraktion aus Kryomaterial (TRIzol® Reagenz)	67
2.2.3.4	Konzentrationsbestimmung der RNA	68
2.2.3.5	cDNA-Erststrang-Synthese (reverse Transkription)	69
2.2.3.6	Verwendete Primer	70
2.2.3.7	Protokolle der PCR für VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2	71
2.2.3.8	Gelelektrophorese- Detektion und Dokumentation	73
2.2.4	<i>Quantitative Real Time (TaqMan) PCR</i>	74
2.2.4.1	Allgemeine Grundlagen	74

2.2.4.2	Verwendete Primer und Sonden.....	75
2.2.4.3	Protokoll der Real Time RT-PCR für VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2	76
2.2.4.4	Auswertung	77
2.2.4.5	Statistische Verfahren	79
2.2.5	<i>Herstellung Digoxigenin-markierter Ribosonden</i>	79
2.2.5.1	Ligation der PCR-Produkte.....	79
2.2.5.2	Transformation der Plasmide in E. coli XL1-Blue Bakterienstämmen.....	81
2.2.5.3	Plasmidextraktion und Restriktionsanalyse	83
2.2.5.4	Sequenzierung des Plasmids	84
2.2.5.5	In vitro Transkription	84
2.2.6	<i>In situ Hybridisierung (ISH)</i>	86
2.2.6.1	Vorbemerkungen	86
2.2.6.2	Protokoll der ISH zum Nachweis von VEGF	87
3	ERGEBNISSE	89
3.1	ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMIE	89
3.1.1	<i>Zytoskelettbestandteile</i>	89
3.1.2	<i>VEGF-System</i>	99
3.2	ERGEBNISSE DES WESTERN BLOTS.....	109
3.3	ERGEBNISSE DER RT-PCR	112
3.4	ERGEBNISSE DER REAL TIME RT-PCR.....	114
3.4.1	<i>Ergebnisse der Real Time RT-PCR für den Hund</i>	114
3.4.2	<i>Ergebnisse der Real Time RT-PCR für die Katze</i>	116
3.5	ERGEBNISSE DER IN SITU HYBRIDISIERUNG	119
4	DISKUSSION	123
4.1	KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODEN	123
4.2	LOKALISATION ZYTOSKELETALER FILAMENTE IN DER ENDOTHELIOCHORIALEN PLAZENTA VON HUND UND KATZE	127
4.3	EXPRESSION VON VEGF, VEGFR-1 UND VEGFR-2 IN DER CANINEN UND FELINEN PLAZENTA	132
4.3.1	<i>Bedeutung des VEGF-Systems für die Angiogenese</i>	132
4.3.2	<i>Bedeutung des VEGF-Systems für die Trophoblastenregulation</i>	141
4.3.3	<i>Rolle der Deziduazellen</i>	144
4.4	BEDEUTUNG VON VEGF UND SEINEN REZEPTOREN IN DER CANINEN UND FELINEN PLAZENTA	149
5	ZUSAMMENFASSUNG	151
6	SUMMARY.....	154
7	LITERATURVERZEICHNIS	157
8	ANHANG	176
8.1	VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER.....	176
8.2	VERWENDETE STOFFE UND REAGENZIEN	184
8.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE.....	187
8.4	VERÖFFENTLICHTE ABSTRACTS	190
8.5	DANKSAGUNG	191
8.6	ERKLÄRUNG	193

Abkürzungsverzeichnis

α -sm Actin	α -smooth muscle actin
Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
aFGF	acidic fibroblast growth factor
AK	Antikörper
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
Aqua bidest	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	Aqua destillata, einfach destilliertes Wasser
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BLP	Boehringer Lyse Puffer
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N,N-Tetraessigsäure
EVT	extravillous trophoblast
FGF	fibroblast growth factor
Flk-1	fetal liver kinase 1
Flt-1	fms-like tyrosine kinase 1

Flt-4	fms-like tyrosine kinase 4
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
d Gest	Tag der Gestation
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Hd	Hund
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor-1 α
IFAPs	Intermediärfilamentassoziierte Proteine
Ig	Immunglobulin
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ISH	In situ Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDR	Kinase insert domain-containing region
Ktz	Katze
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
μ mol	mikromolar
mM	millimolar
mRNA (mRNS)	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnological Information
Nco	Nocardia corallina
Not	Nocardia otitidis-caviarum
NO	Stickstoffmonoxid
NTB	Natriumchlorid-Tris-Puffer
NP-1	Neuropilin-1
NP-2	Neuropilin-2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered substrate)

PBSM	PBS mit Magnesiumchlorid
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	platelet-derived growth factor
PGE ₂	Prostaglandin E2
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
Plac	Plazenta
PlGF	Placental growth factor
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RGE	relative Gen-Expression
RNA (RNS)	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natrium Dodecylsulfat)
sFlt-1	soluble fms-like tyrosine kinase 1
SSC	Natriumzitat (sodium salt citrate)
sVEGFR-1	soluble VEGFR-1
Taq	Thermus aquaticus
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TG	Tris-Glyzin
TGF- α	Transforming growth factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumour necrosis factor- α
TNMT	Tris-Natriumchlorid-Magnesium-Puffer mit Triton X-100
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	VEGF-Rezeptor-1
VEGFR-2	VEGF-Rezeptor-2
VPF	Vascular permeability factor

VRP	VEGF-related protein
(v/v)	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
Wo	Woche
(w/v)	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Grundlagen der Plazentation beim Fleischfresser

Hund und Katze besitzen laut der Einteilung der Plazenta-Typen nach Strahl (1906), also einer Einteilung der Plazenten nach ihrem Verhalten unter der Geburt, eine deziduate Plazenta. Bei der deziduaten Plazenta kommt es zu einer sehr innigen Verbindung zwischen Chorion und Endometrium, mit teilweisem Gewebeabbau, und bei der Geburt werden die veränderten Teile der Uterusschleimhaut als Dezidua (hinfällige Haut, lat. deciduus: abfallend) abgestoßen. Dabei entstehen Wundflächen und Blutungen, die Regeneration der Gebärmutter Schleimhaut erfolgt im Puerperium (Schnorr 1996). Von der tiefen Drüsenschicht ausgehend entsteht das Endometrium neu und wird vom unversehrten Epithel der Paraplazentarzone überwachsen (Rüsse und Sinowatz 1991).

Histologisch gesehen besitzen Hund und Katze eine Placenta endotheliochorialis. Die Einteilung der Plazenten nach Grosser (1927) erfolgt hier nach den trennenden Schichten zwischen mütterlichem und fetalem Blutkreislauf. Die Bezeichnung richtet sich nach dem Gewebe, mit welchem das Chorion in Kontakt steht. Laut Definition dringen die Chorionzotten nach Abbau des Uterusepithels so weit vor, dass sich das Chorion bei der endotheliochorialen Plazenta direkt an das Endothel der mütterlichen Gefäße anlegt (Grosser 1927). Bis auf die Kapillaren werden also bei der endotheliochorialen Plazenta alle Schichten des Endometriums abgebaut (Rüsse und Sinowatz 1991).

Die endotheliochoriale Verbindung entsteht durch Eindringen des Synzytiotrophoblasten in das zelluläre Endometrium (Barrau et al. 1975). Hierbei dringen die Chorionzotten in die Uterusschleimhaut ein und zerstören das Uterusepithel und den oberflächlichen Teil des Endometriums bis zu den Endothelien der Blutgefäße. Bei den meisten Fleischfressern erfolgt die Ausbildung der Zotten im mittleren Bereich des Chorions (Björkman 1970; Mossmann 1987) und führt zum Aufbau einer Gürtelplazenta, der Placenta zonaria (Leiser und Kaufmann 1994). Diese nimmt in der Mitte der Trächtigkeit etwa 1/4 der Fruchtblase ein, gegen Ende der Trächtigkeit 1/5 (Schnorr 1996). In diesem Bereich ist die materno-embryonale Verbindung am intensivsten (Leiser 1982). Der Typ der feto-maternalen Interdigitation beziehungsweise der inneren plazentaren Struktur von Hund und Katze wird als lamellär oder komplex gefaltet bezeichnet (Dantzer et al. 1988; Björkman et al. 1989; Leiser und Kaufmann

1994). Bei Hund und Katze umschließt der Plazentagürtel die Frucht ganz, bei den Musteliden beispielsweise tut er dies nur unvollständig (Rüsse und Sinowatz 1991).

Des Weiteren handelt es sich um eine temporäre choriovitelline Plazenta (Amoroso 1952; Mossmann 1987; Leiser und Koob 1993), bei der das Chorion über Dottersackgefäße mit der fetalen Zirkulation verbunden ist (Leiser und Kaufmann 1994). Sie bleibt die gesamte Trächtigkeit über bestehen und macht circa 10 % der Plazentaoberfläche aus (Leiser und Kaufmann 1994).

Die eindringenden zungen- oder lanzettförmigen Chorionzotten wandeln sich bei der Katze zwischen Tag 15-20 und beim Hund zwischen Tag 17-24 zu Chorionlamellen um, die bis an die Drüsenkammern heranwachsen. Sie bilden vielfach verzweigte Falten aus und zwischen den Chorionlamellen wird ein zusammenhängendes endometriales Lamellensystem, das sogenannte Plazentalabyrinth, gebildet (Janssen 1933; Leiser und Koob 1993), in welchem die Uterusschleimhaut bis auf das Endothel der Gefäße abgebaut wird. Die fetalen Chorionlamellen bestehen aus dem Trophoblasten, dem fetalen Bindegewebe und den dünnwandigen fetalen Kapillaren (Wynn und Corbett 1969), das endometriale Lamellensystem besteht aus den dickwandigeren maternalen Gefäßendothelien und den an späterer Stelle beschriebenen Deziduazellen (Amoroso 1952; Leiser und Koob 1993). Während bei der Katze die Haupt- und Nebenblätter der Chorionlamellen die gleiche Dicke aufweisen, sind beim Hund die verzweigten Hauptblätter weniger gestreckt und besitzen mehr und kürzere Nebenblätter (Kehrer 1973). Das Labyrinth der Hundeplazenta ist verzweigter als das der Katze und das reife Plazentalabyrinth der Katze ist durch untypisch gerade und parallel verlaufende Trophoblastlamellen gekennzeichnet (Mossmann 1987; Rüsse und Sinowatz 1991). Janssen (1933) geht davon aus, dass die Zottenspitzen mit ihren hochprismatischen Ektodermzellen fermentativ wirken und der Verdauung dienen, während die Zottenseiten mit ihren niedrigeren Chorionektodermzellen der Atmung dienen.

Bei der Katze beginnt die Invasion des Trophoblasten in das Endometrium zwischen dem 13. und 14. Tag post coitum (p.c.) (Denker et al. 1978), bei der Hündin am 13. Tag p.c. (Barrau et al. 1975). Leiser (1979) präziserte den Implantationsbeginn bei der Katze auf die 2. Hälfte des 13. Tages nach erstmals erfolgtem Coitus. Die Implantation besteht aus drei nicht deutlich voneinander trennbaren Phasen: der Apposition, der Adhäsion und der Intrusion. In der vorausgehenden Vorkontaktphase werden während des frühen 13. Tages p.c. erstmals Implantationskammern als Schwellungen außen am Uterushorn sichtbar. In dieser Phase ist der Trophoblast einschichtig und kubisch. Die Anheftung des Keimes erfolgt zwischen dem sich unmittelbar außerhalb des Embryonalschildes befindenden Trophoblasten und dem

antimesometrialen Endometrium und breitet sich dann entsprechend der künftigen Plazenta gürtelförmig bis zum abembryonalen Teil der Blastozyste beziehungsweise bis ins mesometriale Endometriumsgebiet aus. In der Appositionsphase bilden sich Mitte des 13. Tages erstmals punktuelle Appositionsstellen zwischen Trophoblast und Uterusepithel aus, was den Beginn der Implantation histologisch kennzeichnet. Die Blastozyste kann zu diesem Zeitpunkt noch ohne Beschädigungen vom Endometrium gelöst werden, was das typische Kennzeichen der Appositionsphase ist (Leiser 1981). Der Trophoblast ist nun einschichtig und hochprismatisch. An den Interzellular-Kontaktstellen zwischen Trophoblast und Uterusepithel bilden sich die Mikrovilli an beiden Epithelien weitgehend zurück. In der Adhäsionsphase ragen in Vielzahl vorkommende Trophoblastabschnitte knopfartig ins Uterusepithel vor. So entsteht eine embryo-maternale Verbindung, welche nicht mehr ohne Schädigung des Trophoblasten und der Endometriums Oberfläche gelöst werden kann. Des Weiteren wird die Kontaktfläche der beiden Epithelien durch unregelmäßig interdigitierende Mikrovilli vergrößert und durch Verbindungskomplexe (junctional complexes) wird die Adhäsion weiter verstärkt (Leiser 1979). Als Folge einer weiter verfestigten Verbindung zwischen Trophoblast und Endometrium verschwindet in der Intrusionsphase das Uteruslumen vollständig. Im Bereich der Drüsenmündungen ist der helle Zytotrophoblast mehrschichtig kubisch und besonders mitoseaktiv, hier beginnt die Chorionzottenbildung. Zum Uterus hin hat sich aus dem Zytotrophoblasten eine synzytiale Schicht ausgebildet, der im Vergleich zum hellen Zytotrophoblasten dunkle Synzytiotrophoblast (Barrau et al. 1975; Leiser 1979). Der eindringende Trophoblast phagozytiert das zerstörte maternale Gewebe und wächst bis ans Kapillarbett vor, welches er umrundet, um eine enge Verbindung mit den mütterlichen Gefäßen einzugehen (Barrau et al. 1975). Zwischen dem Synzytiotrophoblasten und dem uterinen Gefäßendothel bleibt nur ein unregelmäßiger Streifen mütterlichen Interstitiums übrig, die sogenannte interstitielle Matrix, und nur an einigen Stellen kommen Trophoblastenvorsprünge in direkte Berührung mit dem Gefäßendothel (Leiser 1979; Leiser 1982). Damit wird der klassische endotheliochoriale Plazentationsstatus der Katze mit dem Ende der Implantation am 14. Tag p.c. erstmals erreicht (Leiser 1979). Die maternale Basallamina (interstitielle Matrix) des Hundes ist dicker als die der Katze (Wynn und Corbett 1969). Die Plazentarschranke von Hund und Katze besteht also aus drei zellulären Schichten: dem Endothel der maternalen Kapillaren, dem zellulären und synzytialen Trophoblasten und dem fetalen Gefäßendothel sowie aus zwei Lagen nicht zellulärer Substanz: der Basalmembran (oder interstitiellen Matrix) zwischen dem maternalen Endothel und dem

synzytialen Trophoblasten und der Basalmembran zwischen dem Trophoblast und dem fetalen Endothel (Amoroso 1952; Wynn und Corbett 1969; Rüsse und Sinowatz 1991).

Aus den durch Zerstörung durch die eindringenden Chorionzotten zerfallenen maternalen Epithel- und Bindegewebszellen entsteht das als Histiotrophe dienende Symplasma maternum. Durch den Gewebeabbau kommt es zu einem sehr engen Kontakt zwischen mütterlichen Kapillaren und Chorionepithel und somit zu einer zunehmenden Versorgung des Fetus über Hämotrophe, wobei die maternalen Kapillaren direkt vom Trophoblasten umgeben sind (Wynn und Corbett 1969). Der Trophoblast besitzt hier eine deutlich resorptive Aktivität (Leiser 1979).

Zwischen dem Plazentalabyrinth und dem Endometrium befindet sich die Schicht der Drüsenkammern (Grether et al. 1998). Die Chorionlamellen, die als Haupt- und Nebenblätter angeordnet sind, stehen ab dem 25. Tag p.c. in engem Kontakt zu den Drüsenkammern (Kehrer 1973) und reichen vom Labyrinth bis in das Lumen der Drüsen (Grether et al. 1998). Die Drüsenkammern, auch „spongy zone“ genannt, entstehen während der Implantation des Embryos aus den oberflächlichen endometrialen Drüsen (Grether et al. 1998). Unterhalb der Drüsenkammern liegen die Drüsendeckschicht und darunter die tiefe Drüsenschicht. Bei der Katze entstehen die Drüsenkammern im Gegensatz zum Hund nur andeutungsweise (Rüsse und Sinowatz 1991), während sie beim Hund extrem erweitert sind und laut Kehrer (1973) ebenso viel Platz wie das Chorion einnehmen. Beim Hund erreichen die Drüsenkammern um den 40. Tag p.c. ihre volle Größe. Sie sind bis dahin mit einem kubischen Epithel ausgekleidet, das nur wenige Mikrovilli trägt. Mit fortschreitender Trächtigkeit (ab dem zweiten Drittel) entwickelt es sich zu einem hochprismatischen Epithel mit langen apikalen Zellprotrusionen (Grether et al. 1998).

Das Chorionepithel besteht aus zwei Zellpopulationen, dem äußeren Synzytiotrophoblasten und dem inneren Zytotrophoblasten (Amoroso 1952; Sandoval et al. 2001). Der Synzytiotrophoblast differenziert sich aus dem Zytotrophoblasten ab dem 14. Tag p.c., wobei eine Verbindung zwischen den zwei Trophoblasttypen durch lockere Berührung der Mikrovilli und durch einzelne Desmosomen gegeben ist (Leiser 1979). Der Synzytiotrophoblast stellt die invasive Form des Trophoblasten dar, welcher das uterine Gewebe erodiert (Leiser und Enders 1980a; Sandoval et al. 2001). Der Synzytiotrophoblast der Verbindungszone zur Paraplazenta (s.u.) ist als invasivere Form des Synzytiotrophoblasten anzusehen als der des Implantationsgürtels, denn hier erodiert er das uterine Gewebe einschließlich der interstitiellen Matrix und des maternalen Endothels und

führt zum Zusammenbruch der maternalen Gefäße, während er im Bereich des Implantationsgürtels zwar bis an das maternale Gefäßendothel heranwächst, dieses aber nicht zerstört (Leiser und Enders 1980a; Leiser 1982). Maternale Gefäße und Deziduazellen sind in der endotheliochorialen Plazenta also ausschließlich mit dem Synzytiotrophoblasten in direktem Kontakt (Barrau et al. 1975).

Leiser (1982) teilte den Trophoblasten auch nach dem Stand der Implantation ein. Während der Preimplantation entwickelt sich ein morphologisch primitiver Trophoblast, welcher von der Zona Pellucida umhüllt ist. Er besteht aus einem einfachen, mitotisch sehr aktiven Plattenepithel. In der Vorkontaktphase entsteht der Vorkontakt-Trophoblast, welcher durch ein einfaches kubisches Epithel gekennzeichnet ist und sich gürtelförmig zu den abembryonalen Polen der Blastozyste ausbreitet. Während der Implantation nähert sich der nun hochprismatische appositive Trophoblast dem antimesometrialen Endometrium, knüpft mit diesem erste Kontaktpunkte und zeigt Mikropinozytose-Aktivität. In der Adhäsionsphase entwickelt sich der adhäsive Trophoblast, welcher die appositiven Kontaktpunkte zu größeren Regionen erweitert, und durch Mikrovilli und Verbindungskomplexe entsteht eine embryomaternale Verzahnung zwischen dem Epithel des Trophoblasten und dem Uterusepithel. Der Trophoblast ist nun mehrschichtig und zeigt Phagozytose-Aktivität. In der Intrusionsphase differenziert sich aus dem mehrschichtigen, kubischen Zytotrophoblasten zur uterinen Seite hin der Synzytiotrophoblast. Diese beiden Trophoblasttypen, als intrusiver Trophoblast zusammengefasst, verstärken die embryomaternale Verbindung durch lange, zum Endometrium wachsende Fortsätze (Leiser 1982).

Gegen Ende der Trächtigkeit kommt es zu einer Reduzierung des Zytotrophoblasten (Amoroso 1952; Anderson 1969; Wynn und Corbett 1969; Boomsma et al. 1991; Leiser und Koob 1993; Boomsma et al. 1997), die in der Plazenta des Hundes stärker ausgeprägt ist als bei der der Katze (Wynn und Corbett 1969).

Bei Hund und Katze kommen im mütterlichen Gewebe des Plazentalabyrinths außerdem große, helle Deziduazellen vor. Dabei handelt es sich um persistierende, zu außergewöhnlicher Größe transformierte endometriale Stromazellen (Amoroso 1952; Leiser und Kaufmann 1994), die sich zwischen den mütterlichen Kapillaren der plazentaren Lamellen (und dem Synzytiotrophoblasten) befinden (Anderson 1969; Leiser und Koob 1993; Leiser und Kaufmann 1994) und auch Riesenzellen genannt werden (Mossmann 1987). Anderson (1969) hat das Vorkommen der maternalen Deziduazellen auch bei der Hündin erstmals beschrieben. Er berichtet, dass die Deziduazellen in den meisten Fällen nur durch die

interstitielle Membran vom maternalen Endothel getrennt sind. Er vermutet eine Funktion dieser Zellen in der Limitierung der Trophoblasteninvasion oder der Bereitstellung von Nahrung für den invadierenden Trophoblasten. Im Gegensatz zu der Katze, wo Deziduazellen in großen Mengen auftreten (Rüsse und Sinowatz 1991), sind sie in der Hundeplazenta nur spärlich vertreten (Barrau et al. 1975).

Seitlich der Gürtelplazenta liegt die Paraplazenta, welche aus der Extravasatzone sowie der Kontakt- oder Freipolarzone besteht. Die Extravasatzone entsteht durch Zerstörung mütterlicher Gefäße und dadurch hervorgerufenen Blutungen direkt am Rand der Gürtelplazenta, welche das Chorion vom Uterusepithel abheben und in Uteruskrypten und Drüsentubuli eindringen. Aufgrund der Lage der Extravasate bezeichnet man diese als Randhämatome. In diesen phagozytieren Zytotrophoblastzellen maternale Erythrozyten (Wynn und Corbett 1969; Barrau et al. 1975; Leiser und Enders 1980b; Malassine 1982; Mossmann 1987). Die Phagozytose der Erythrozyten geschieht durch Pseudopod-ähnliche Zellfortsätze, welche die Erythrozyten und Erythrozytenfragmente stufenweise einhüllen und inkorporieren (Leiser und Enders 1980b). Aus dem Hämoglobin entstehen dabei Eisenverbindungen, welche beim Hund den „grünen Saum“ (Grosser 1909) und bei der Katze den „braunen Rand“ der Plazenta verursachen. Die Hämatome der Katze beinhalten sehr wenig freies Blut, aber die auskleidenden Zytotrophoblastzellen sind mit phagozytierten mütterlichen Erythrozyten schwer beladen (Mossmann 1987). Die Farbunterschiede deuten auf unterschiedlich alte Hämatome. Bei den rötlich braunen Hämatomen der Katze handelt es sich um frische Hämatome, die durch kontinuierliche Erythrophagozytose und Extravasation der mütterlichen Gefäße erhalten werden. Im Gegensatz dazu sind die dunkelgrünen, massigen Hämatome der Caniden vergleichsweise älter (Mossmann 1987). Die paraplazentare Erythrophagozytose dient als Hauptquelle für die Eisenversorgung des Fetus (Malassine 1982; Rüsse und Sinowatz 1991).

Entlang der Extravasatzone befinden sich sogenannte Verbindungszonen (paraplacental junctional areas) (Leiser und Enders 1980a). In diesen zeigt der kubische Zytotrophoblast eine hohe Mitoserate und scheint sowohl die Fähigkeit zur Digestion als auch zur Transformation zu besitzen; der Synzytiotrophoblast ist in diesem Bereich auch zur Erythrophagozytose befähigt (Leiser und Enders 1980a). Über den fetomaternalen Kontakt der Verbindungszonen wird möglicherweise die Ausdehnung der Hämatome über eine Kontrolle der Hohlraumgröße, in welche extravasiertes Blut fließen kann, reguliert (Leiser und Enders 1980a). Weiterhin wird durch die Aggressivität des Synzytiotrophoblasten der Zusammenbruch der maternalen

Gefäße beeinflusst, welcher in der Extravasation von maternalem Blut resultiert (Leiser und Enders 1980a; Leiser 1982). Die Verbindungszone der Paraplazenta degeneriert nach einer Phase der Aktivität gegen Mitte/Ende der Trächtigkeit (Janssen 1933; Leiser und Enders 1980a; Leiser 1982), und die entstehende histolytische Embryotrophe wird von den benachbarten proliferativen, kubischen Trophoblastzellen phagozytiert (Leiser und Enders 1980a).

Die Kontakt- oder Freipolarzone stellt den Übergang zu dem kontaktfreien interplazentaren Bereich der Polkappen der Fruchtblase dar, die von Janssen (1933) und Björkman (1957) auch als Initialzone bezeichnet wurde. Hier sezerniert das Endometrium glanduläre Sekrete, die als Histiotrophe vom Chorion resorbiert werden. Die Freipolarzone ist frei von Chorionzotten und der dem Uterusepithel anliegende Zytotrophoblast ist einschichtig, besteht aus kubischen Zellen (Janssen 1933; Björkman 1957; Leiser und Enders 1980b), ist zur Phagozytose der Histiotrophe fähig (Leiser und Enders 1980b) und bleibt proliferativ (Rüsse und Sinowatz 1991).

Zwischen den Implantationskammern befindet sich die Interplazenta, in der das Endometrium während der Plazentation im präimplantativen Zustand erhalten bleibt. Der Zytotrophoblast der interplazentaren Polarzone bleibt proliferativ, besteht aus flachen bis hochprismatischen Zellen und weist nur geringe pinozytotische Aktivität auf (Leiser und Enders 1980a). In der interplazentaren Polarzone sind die Blutgefäße weniger zahlreich als in der Freipolarzone und der Extravasatzzone (Leiser und Enders 1980a).

Blutversorgung der Plazenta

Das Gefäßsystem der Plazenta ist essentiell für den in der Plazenta stattfindenden maternal-fetalen Stoffaustausch (Leiser et al. 1989). Dieser Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselabbauprodukten zwischen maternalem und fetalem Blut durch die plazentare Barriere hindurch stellt das fetale Wachstum sicher (Cavaille et al. 1995). Eine Adaptation des uterinen Gefäßsystems während der Gravidität erfolgt in allen Säugetieren und ist notwendig, um einen Anstieg des Blutflusses zu gewährleisten (Clausen et al. 2003). Die fundamentalen Entwicklungsschritte, die für eine erfolgreiche Plazentation notwendig sind, sind erstens die Trophoblasteninvasion, zweitens die Vaskularisation des Trophoblasten, um ein fetoplazentares Gefäßsystem zu bilden und aufrechtzuerhalten und drittens eine folgende maternale Gefäßremodellierung, um einen utero-plazentaren Blutkreislauf zu etablieren (Wulff et al. 2003).

Die Gürtelplazenta besteht aus benachbarten zweidimensionalen maternalen oder septalen Kapillarnetzwerken einerseits und fetalen oder chorialen Kapillarnetzwerken andererseits, welche durch gefaltete, mit Trophoblast ausgekleidete Lamellen voneinander getrennt sind (Dantzer et al. 1988). Jeder Bereich der Gürtelplazenta wird von der maternalen Seite der Plazenta aus von einer zentral lokalisierten Stammarterie versorgt, welche viele Gefäßverzweigungen aufweist, die teilweise wiederum Anastomosen mit anderen Gebieten eingehen. Diese Stammarterie durchzieht die Schichten des Myometriums und des Plazentalabyrinths, verzweigt sich dabei vielfach und formt ein trichterförmiges Gefäßsystem auf der fetalen Seite des Labyrinths. Von diesem System ausgehende Arteriolen dringen in das Kapillarnetzwerk der Septen des Labyrinths ein, welches parallel zu den Chorionlamellen verläuft. Dieses maternale Kapillarnetzwerk ist in feto-maternaler Richtung orientiert. An der maternalseitig gelegenen Basis der Septen laufen Venolen aus den Lamellen zu Stammvenen zusammen. Diese Venen verknüpfen das Labyrinth und die tiefen endometrialen Schichten mit einem Venenplexus im Myometrium, welcher sich schließlich dem oberflächlichen Netzwerk der Uterusvenen anschließt (Leiser und Kohler 1983). Beim Hund sind die mütterlichen Gefäße zwischen den Chorionblättern größer als bei der Katze: beim Hund betragen sie im Durchschnitt 20-45 μm , bei der Katze maximal 25 μm (Kehrer 1973).

Von der fetalen Seite aus verlaufen die Verästelungen der zwei Nabelarterien und der Nabelvene parallel zum Plazentargürtel und versorgen das fetale Kapillarnetzwerk an verschiedenen Lokalisationen entlang der Chorionlamellen (Dantzer et al. 1988; Leiser und Koob 1992). Die Anzahl der fetalen Kapillaren nimmt im Verlauf der Trächtigkeit zu (Boomsma et al. 1991). Der Blutfluss des fetalen Kapillarnetzwerks verläuft rechtwinklig zum maternalen Gefäßnetzwerk, dies bezeichnet man als einfaches Querstrom-System (Dantzer et al. 1988; Leiser und Koob 1992; Leiser und Kaufmann 1994).

Die Gefäße im Bereich der Ampulle oder der Gürtelzone der Plazenta sind relativ groß, wohingegen die Gefäße der Paraplazenta und Interplazenta vergleichsmäßig klein und weniger zahlreich sind (Leiser und Kohler 1983). In der Verbindungszone sammeln Venolen auch das Blut des septalen Kapillarennetzwerks.

Diese vaskulären Verbindungen von sowohl arterieller als auch venöser Seite des Labyrinths sichern die Blutversorgung für den wichtigen maternal-fetalen Austausch von Substanzen in dieser Zone (Leiser und Kohler 1983). Allen Plazentatypen ist gemein, dass sich in den späten Stadien der Gestation die physikalische Distanz zwischen maternalem und fetalem Blutstrom durch sogenannte „intraepitheliale“ Kapillaren an den dünnsten Stellen auf 2 μm (Björkman et al. 1989) verringert.

1.2 Das Zytoskelett

Die Fähigkeit von Eukaryontenzellen, verschiedene Formen anzunehmen und koordinierte und gerichtete Bewegungen auszuführen, basiert auf dem Zytoskelett. Das Zytoskelett ist in dem gesamten Zytoplasma verteilt, aus Proteinfilamenten aufgebaut und besitzt eine dynamische Struktur (Alberts et al. 2004).

Man unterscheidet im wesentlichen drei Typen von Proteinstrukturen, die in ihrer Gesamtheit das Zytoskelett der Zelle formen. Dabei handelt es sich zum Einen um Aktinfilamente (Mikrofilamente), zum Zweiten um Intermediärfilamente und zum Dritten um Mikrotubuli. Zusammen machen diese drei filamentösen Netzwerke die wesentlichen Eigenschaften des höheren eukaryotischen Zytoskeletts aus (Fuchs und Weber 1994). Zusätzlich zu den oben genannten Strukturproteinen tritt eine Vielzahl von Proteinen auf, welche diese untereinander verflechten oder die mit dem Plasmalemm in direktem Kontakt stehen oder die in Wechselbeziehung zueinander reagieren (Liebich 1999).

Die Aktinfilamente (Mikrofilamente) haben einen Durchmesser von 7-9 nm, die Intermediärfilamente haben einen Durchmesser von 10 nm und die Mikrotubuli haben einen Durchmesser von 24 nm. Die Fasern des Zytoskeletts werden von Polymeren gebildet, die wiederum aus kleineren Proteinuntereinheiten bestehen, welche durch nichtkovalente Bindungen zusammengehalten werden (Lodish et al. 2001a). Das Verhältnis der einzelnen Zytoskelettproteine zueinander ist nicht genau festgelegt und der flexible Aufbau erlaubt einer Zelle, verschiedene Formen anzunehmen und sich zudem noch leicht zu verändern (Lodish et al. 2001a).

Die Funktionen des Zytoskeletts beinhalten die Gestaltgebung, die Fähigkeit gerichtete und koordinierte Bewegungsvorgänge auszuführen, Organellen innerhalb der Zelle zu transportieren und Signale zu übertragen (Lodish et al. 2001a; Alberts et al. 2004).

1.2.1 Mikrofilamente

Die Mikrofilamente bestehen aus Aktinuntereinheiten und spielen eine Rolle bei den Bewegungsabläufen, wie zum Beispiel der Zellwanderung und dem Transport durch das Zytoplasma. Alle eukaryotischen Zellen enthalten große Mengen an Aktin, es ist das häufigste Protein in einer eukaryotischen Zelle. In Muskelzellen bestehen circa 10 % aller Proteine aus Aktin, in anderen Zellen macht Aktin circa 1-5 % des gesamten zellulären Proteins aus. Zum Aktinzytoskelett ist zu sagen, dass die Länge der einzelnen Filamente über einen großen

Bereich variiert und dass die einzelnen Filamente zu unfertigen Bündeln und Netzwerken verknüpft sind. Aktin ist ein mittelgroßes Protein aus etwa 375 Aminosäuren und wird von einer Familie hochkonservierter Gene kodiert. Bei den Wirbeltieren unterscheidet man vier Isoformen von α -Aktin in den verschiedenen Muskeltypen sowie zwei weitere Isoformen in Nichtmuskelzellen: β - und γ -Aktin. Obwohl sich die Isoformen nur geringfügig unterscheiden, übernehmen sie dennoch ganz spezifische Funktionen: so ist α -Aktin Bestandteil von kontraktilen Strukturen, während β -Aktin an der Polymerisation der Aktinfilamente am Vorderende wandernder Zellen beteiligt ist. Man unterscheidet G-Aktin, ein globuläres Monomer und F-Aktin, welches filamentös ist und aus einer Kette von G-Aktinuntereinheiten besteht. Bei der Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin wird ATP hydrolysiert. Die einzelnen G-Aktinuntereinheiten sind in einer eng gewundenen Helix angeordnet. F-Aktin weist strukturelle und funktionelle Polarität auf, alle Untereinheiten in einem Aktinfilament besitzen die gleiche Polarität, das heißt sie sind in der gleichen Faserrichtung angeordnet (Lodish et al. 2001a).

Die Aufgabe des Aktinzytoskeletts in der Zelle besteht darin, die Plasmamembran durch eine Art Rahmen zu versteifen und daher die Zellgestalt festzulegen. Außerdem bildet die reversible Zusammenlagerung von Aktin die Grundlage für viele Zellbewegungen (Lodish et al. 2001a). Die zwei Hälften eines Aktinmonomers werden von ATP zusammengehalten, die Verknüpfung der einzelnen Aktinfilamente zu Bündeln und Netzen erfolgt durch quervernetzende Proteine wie zum Beispiel Dystrophin in Muskelzellen oder Fimbrin und Fascin in Mikrovilli (Lodish et al. 2001a).

Die Mikrofilamente sind also eine von drei Faserarten, die das Zytoskelett bilden und sie bestehen aus einem Aktinpolymer und daran gebundenen Proteinen (Lodish et al. 2001a). Dabei bildet Aktin sowohl stabile Strukturen wie den kontraktilen Apparat in der Muskelzelle oder den Kern der Mikrovilli als auch veränderliche Strukturen aus, die an der Zellbewegung Beteiligung finden. Die erforderliche Energie wird durch die Hydrolyse von ATP gewonnen (Alberts et al. 2004). Durch die dynamische Natur des Aktinzytoskeletts ist die Gestalt der Zelle nicht starr, sondern unterliegt ständigen Veränderungen (Lodish et al. 2001a). Das Aktinzytoskelett ist weiterhin ein unverzichtbarer Teil der Signal-Übertragungskaskaden von Zellen, weil sich sein dynamisches Geflecht aus Aktinfilamenten in der Zellrinde beim Eintreffen von Signalen aus der Zellumgebung auf die Plasmamembran schnell umformen kann (Alberts et al. 2004).

1.2.2 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind Polypeptidketten, ihr Name kommt daher, dass sie mit einem Durchmesser von circa 10 nm zwischen den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli einzuordnen sind (Fuchs und Weber 1994; Liebich 1999). Intermediärfilamente werden durch Keratine, Vimentin und Lamin repräsentiert und weisen seilartige Struktur auf. Sie sind relativ widerstandsfähig und verleihen Zellen und Geweben ihre mechanische Stabilität (Alberts et al. 2004).

Aufgrund ihrer Struktur und ihrer Aufgabe unterscheiden sich Intermediärfilamente von anderen Zytoskelettfasern. Sie sind eng mit der Plasmamembran assoziiert, darum ist anzunehmen, dass sie eine rein strukturelle Aufgabe übernehmen. Diese liegt in der Verstärkung der einzelnen Zellen und deren Verbindung zu Gewebeverbänden. Die wichtigste Funktion der Intermediärfilamente ist die Verstärkung der Plasmamembran an Stellen, wo Kontakte zu anderen Zellen oder zur extrazellulären Matrix bestehen. Sie weisen eine außerordentliche Stabilität auf und bestehen aus α -helikalen stabförmigen Untereinheiten, die sich zu seilartigen Filamenten zusammenlagern. Alle Intermediärfilament-Proteine haben einen zentralen α -helikalen Abschnitt, der von globulären N- und C-terminalen Domänen flankiert wird; das Molekulargewicht und die Sequenz der N- und C-terminalen Domänen sind für jedes Intermediärfilament-Protein spezifisch. Die zentrale Domäne besteht aus vier langen α -Helices, die durch drei nichthelikale Regionen voneinander getrennt sind. Ein Intermediärfilament besteht aus vier Protofibrillen, dieses aus zwei Protofilamenten, dieses wiederum aus Tetrameren und die Tetramere bestehen aus zwei Dimeren, die durch die α -helikalen Segmente gebildet werden (Lodish et al. 2001b). Im Gegensatz zu den Mikrofilamenten spielen sie keine Rolle bei Bewegungsabläufen. Man unterteilt die Intermediärfilamente nach ihren Sequenzen in sechs Gruppen, von denen die Lamine in allen Zellen, die übrigen Intermediärfilament-Proteine jedoch nur in ganz bestimmten Geweben exprimiert werden (Lodish et al. 2001b). Die Einteilung der Intermediärfilamente in ihre Gruppen (Fuchs und Weber 1994; Lodish et al. 2001b):

Typ I: Saure Keratine

Typ II: Basische Keratine

Typ III: Vimentin- und Desminfilamente sowie fibrilläres saures Gliaprotein und Peripherin

Typ IV: Neurofilamente und Internexin

Typ IV (untypisch): Filensin und Phakinin

Typ V: Lamine

Zytokeratine bestehen aus keratinartigen Proteinen und stellen die vielfältigste Gruppe der Intermediärfilamente dar. Sie sind typisch für epitheliale Zellen (Sun et al. 1979; Khong et al. 1986; Konoplev et al. 2004), und es hat sich herausgestellt, dass sie essentiell für die Aufrechterhaltung der mechanischen Eigenschaften der epithelialen Gewebe sind (Chou et al. 1997). Keratine setzen sich aus verschiedenen Kombinationen von Polypeptiden zusammen, die einen isoelektrischen pH-Wert zwischen fünf und acht besitzen und ein Molekulargewicht von 40 bis 68 kDa haben (Moll et al. 1982). Es gibt circa 20 Zytokeratine, normalerweise befinden sie sich in Epithelgeweben, mit denen die Körperhöhlen ausgekleidet sind. Anhand der Aminosäuren-Sequenz können zwei Typen von Keratinen unterschieden werden: die sauren Keratine des Typs I und die basischen Keratine des Typs II. Dabei exprimiert jedes Epithelgewebe eine charakteristische Kombination von Keratinen der Typen I und II (Lodish et al. 2001b). Meist kommen mehrere verschiedene Zytokeratine gleichzeitig in einer Zelle vor und weisen dabei ein für jedes Epithel spezifisches Ausprägungsmuster auf (Moll et al. 1982; Lodish et al. 2001b).

Die Zytokeratine werden bei Untersuchungen von Plazentastrukturen bei Tieren zur Detektion des Trophoblastenepithels sowie des Uterusepithels verwendet.

Vimentin gehört zum Typ III der Intermediärfilament-Proteine und ist von allen Intermediärfilament-Proteinen am weitesten verbreitet. Es befindet sich typischerweise in mesenchymalen Zellen, in den Endothelzellen der Blutgefäße, in Leukozyten und in einigen Epithelzellen. Die Vimentinfilamente stellen eine Stützfunktion für die Plasmamembran und andere zelluläre Membranen dar (Lodish et al. 2001b).

In der Zelle verhalten sich die Intermediärfilamente als dynamische Polymere, aber trotz ihrer dynamischen Eigenschaften sind sie erheblich stabiler als Mikrotubuli und Mikrofilamente (Lodish et al. 2001b). Einige Funktionen der Intermediärfilamente werden sowohl durch ihre mechanischen wie auch durch ihre dynamischen Eigenschaften vermittelt (Chou et al. 1997). Intermediärfilamentassoziierte Proteine (IFAPs) vermitteln Wechselwirkungen zwischen einzelnen Intermediärfilamenten und verknüpfen diese zu Bündeln oder Netzwerken, welche die Struktur der Zellen stabilisieren, oder binden die Intermediärfilamente an andere Zellstrukturen wie zum Beispiel die Zellmembran, und sind daher essentiell für die Aufrechterhaltung der Integrität des Intermediärfilament-Netzwerkes (Fuchs und Weber 1994; Chou et al. 1997; Lodish et al. 2001b).

Aktin, Vimentin und Zytokeratin bei verschiedenen Plazentatypen

Die Identifikation der verschiedenen Gewebe innerhalb der Plazenta kann durch Analyse der Expression der verschiedenen Filamente des Zytoskeletts vereinfacht werden. Diese Methode ist gut etabliert und wurde bereits zur Charakterisierung anderer Plazenta-Typen, wie der epitheliochorialen Plazenta des Rindes (Pfarrer 2006), der hämochorialen Plazenta des Meerschweinchens, des Makaken und des Menschen (Khong et al. 1986; Blankenship und King 1993; Blankenship et al. 1993b; Carter et al. 1998), wie auch der endotheliochorialen Plazenta des Nerzes (Winther et al. 1999b) und der Katze (Walter und Schonkypl 2006) genutzt.

Die Zytokeratine werden bei Untersuchungen von Plazentastrukturen bei Tieren zur Detektion des Trophoblastenepithels verwendet. In der Humanmedizin werden ebenfalls Antikörper gegen Zytokeratine zur Identifizierung der verschiedenen Trophoblastzellpopulationen eingesetzt (Khong et al. 1986; Bradbury und Ockleford 1990; Daya und Sabet 1991; Goffin et al. 2003). Allerdings sind hier neben der Erkennung des Trophoblasten vor allem die verschiedenen Formen und Lokalisationen des Trophoblasten Gegenstand der Forschung. Auch in Zellkulturen werden die Anwesenheit von Zytokeratin und die Abwesenheit von Vimentin üblicherweise als Marker für den Trophoblasten eingesetzt (Haigh et al. 1999; Potgens et al. 2001).

So wurden zum Beispiel aus der Mäuseplazenta isolierte Trophoblastzellen mittels Zytokeratinen charakterisiert (Zuckermann und Head 1986). Im Trophektoderm der Blastozyste sowie in den Trophoblast-Riesenzellen der Ratte wurden mit Hilfe der Gel-Elektrophorese mehrere, für einschichtige Epithelzellen charakteristische Zytokeratine nachgewiesen (Glasser und Julian 1986b). In der Immunhistochemie wurden die Trophoblastzellen der Ratte, des Meerschweinchens und der Maus (Clausen et al. 2003; Miglino et al. 2004; Caluwaerts et al. 2005; Nie et al. 2005), sowie die Trophoblast-Riesenzellen der Maus (de Souza und Katz 2001) ebenfalls mit Antikörpern gegen Zytokeratin identifiziert (Clausen et al. 2003). Auch in der Plazenta des Makaken wurden zur Darstellung des Trophoblasten Antikörper gegen Zytokeratine eingesetzt (Blankenship et al. 1993a; Blankenship et al. 1993b; Blankenship und King 1993; Enders und Blankenship 1997). In der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze wurde im Rahmen der Analyse des Vorkommens von Relaxin Zytokeratin als Marker für Trophoblastzellen verwendet (Klonisch et al. 1999a; Klonisch et al. 1999b). Bei Untersuchungen an Fledermaus-

Plazenten wurde eine Koexpression von Zytokeratin und Vimentin in dezidualen Riesenzellen festgestellt sowie die Expression von Zytokeratin in Trophoblastzellen (Badwaik et al. 1998; Rasweiler et al. 2000).

Vimentin ist das Haupt-Intermediärfilament der Zellen, die vom embryonalen Mesoderm abstammen, und ist damit auch in Zellen des Bindegewebes zu finden (Can et al. 1995). Daher wird Vimentin als Marker für mesenchymale Zellen und für stromale Dezidua genutzt (Faulk et al. 1990; Carter et al. 1998; Miglino et al. 2004). Can et al. (1995) wiesen Vimentin in humanen endometrialen Deziduazellen in immunhistochemischen Untersuchungen sowie in der Zellkultur nach und mittels zweidimensionaler Gel-Elektrophorese und Western Blot wurden die Intermediärfilament-Proteine der Deziduazellen der Ratte als Vimentin und Desmin identifiziert (Glasser und Julian 1986a). Aktin und Vimentin wurden bei immunhistochemischen Untersuchungen an der Plazenta des Nerzes in Deziduazellen gefunden (Winther et al. 1999b). Auch bei Untersuchungen an der Plazenta des Meerschweinchens waren das endometriale Stroma sowie die Dezidua immunopositiv für Vimentin (Carter et al. 1998) und die glatte Muskulatur der Gefäße zeigte Reaktionen für Aktin (Clausen et al. 2003). Ebenso wiesen die endometrialen Stromazellen des Hundes eine Immunreaktivität für Vimentin auf (Galabova-Kovacs et al. 2004). In den Endothelzellen der humanen plazentaren Gefäße zeigt Vimentin eine hohe Expressionsrate (Bradbury und Ockleford 1990). Ebenso waren die Endothelien der Gefäße in der Plazenta des Meerschweinchens Vimentin-positiv, wobei die fetalen Kapillaren besonders intensiv gefärbt waren (Carter et al. 1998).

Mittels Gel-Elektrophorese wiesen Cavaille et al. (1995) eine hohe Expressionsrate von Aktin in humanen fetoplazentaren Gefäßen nach und auch bei immunhistochemischen Untersuchungen an der humanen Plazenta wird Aktin zur Identifizierung der glatten Muskulatur der Gefäße verwendet (Labarrere und Faulk 1994). Untersuchungen an der Plazenta der Ratte ergaben ebenfalls immunopositive Ergebnisse für Aktin in der glatten Muskulatur der Gefäße (Caluwaerts et al. 2005).

1.3 Angiogenese in der Plazenta

Für die plazentare Entwicklung und Morphogenese spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle, da jedes Gewebewachstum von Angiogenese begleitet wird bzw. Angiogenese eine Voraussetzung für das Wachstum ist.

Die plazentare Neovaskularisation ist ein physiologischer Vorgang, der durch einen initialen dramatischen Anstieg der Blutgefäße durch Angiogenese auf der maternalen Seite und Vaskulogenese auf der embryonalen Seite der Plazenta charakterisiert ist (Winther und Dantzer 2001).

Damit bildet die Plazenta eine Ausnahme, denn ansonsten stellt die Neubildung von Gefäßen in adulten Geweben ein relativ seltenes Phänomen dar. Ausnahmen sind periodische Veränderungen des Ovars, des Endometriums, der Plazenta sowie einige Krankheitsbilder, wie chronische Entzündungen oder das Tumorstadium (Norrby 1997; Cheung et al. 1998).

Die Säugetierplazenta ist ein Organ, durch welches Atemgase, Nährstoffe und Abfallprodukte zwischen den maternalen und fetalen Systemen ausgetauscht werden. Der transplazentare Austausch gewährleistet alle metabolischen Ansprüche des fetalen Wachstums und der Entwicklung. Das Maß und die Effizienz des transplazentaren Austauschs hängt in erster Linie von der Höhe des uterinen (maternal plazentar) und umbilikalen (fetal plazentar) Blutflusses ab (Reynolds und Redmer 2001; Regnault et al. 2002). Die Höhe des plazentaren Blutflusses wiederum hängt von der plazentaren Vaskularisation ab, und folglich ist die plazentare Angiogenese entscheidend für die erfolgreiche Entwicklung lebensfähiger, gesunder Nachkommen (Reynolds und Redmer 2001). Das Myometrium besitzt ein reichliches und anpassungsfähiges Gefäßsystem. Myometriale Blutgefäße machen während der Gravidität ein bedeutendes Wachstum und Remodellierung durch, um den steigenden Ansprüchen des sich entwickelnden Fetus gerecht zu werden (Weston et al. 2002). Dieses wurde eindrucksvoll für die maternalen Blutgefäße der endotheliochorialen Nierzplazenta gezeigt (Krebs et al. 1997). Somit sind die plazentare Angiogenese und Wachstum entscheidende Elemente in der embryonalen und später fetalen Entwicklung (Winther et al. 1999a).

In der Plazenta treffen sich also zwei Gefäßsysteme, das maternale und das fetale. Diese sind die grundlegenden Lieferanten, um einen transplazentaren Substanztausch zu garantieren,

der, wenn er aus der Balance gerät, fetale Entwicklung und Wohlbefinden stark beeinträchtigen kann (Dantzer et al. 2000).

Die Plazentation beinhaltet umfangreiche Angiogenese im maternalen und fetalen Plazentagewebe, begleitet von einem merklichen Anstieg des uterinen und umbilikalen Blutflusses (Reynolds und Redmer 2001). Da der Trophoblast per se ein avaskuläres Gewebe ist muss er, um am maternal-fetalen Austausch teilhaben zu können, eine funktionsfähige Zirkulation entwickeln. Daher sind auf der fetalen Seite zwei Prozesse, Vaskulogenese und Angiogenese, in die fetale Gefäßentwicklung involviert (Wulff et al. 2003).

Blutgefäße entwickeln sich generell durch folgende zwei Prozesse: einmal der Vaskulogenese, unter der man die Formation erster primitiver Kapillaren durch Differenzierung hämangiogener Stammzellen, die von pluripotenten Mesenchymzellen stammen, versteht. Die daraus resultierenden Angioblasten entwickeln sich zu endothelialen Vorläuferzellen. Die Vaskulogenese ist also die de novo Formation von Gefäßen und findet nur während der Embryogenese statt. Zum Zweiten durch Angiogenese, unter der man den Prozess der Entwicklung neuer Blutgefäße ausgehend vom bereits bestehenden Gefäßsystem versteht. Dies beinhaltet die Migration und Proliferation von Endothelzellen in Verbindung mit einer Remodellierung der existierenden Basalmembran und der extrazellulären Matrix (Hanahan und Folkman 1996; Klagsbrun und D'Amore 1996; Norrby 1997; Redmer et al. 2001; Ribatti 2005; Demir et al. 2006).

Die Angiogenese wird durch das netto-Gleichgewicht zwischen Molekülen, die positive und negative regulatorische Wirksamkeit haben, kontrolliert (Pepper 1997), also durch pro- und antiangiogene parakrine Peptidmoleküle (Norrby 1997). Dieses Konzept führte zu dem Begriff „angiogenic switch“, der von einer steigenden Produktion von einem oder mehreren positiven Regulatoren der Angiogenese abhängig ist (Ribatti 2005). In aktivierten (angiogenen) Endothelien herrschen positive Regulatoren vor, wohingegen ruhende Endothelien durch die Dominanz von negativen Regulatoren erreicht und aufrechterhalten werden (Pepper 1997). Das Verhältnis von pro- und antiangiogenen Wachstumsfaktoren ist für die Entwicklung des Gefäßsystems der Säugetierplazenta entscheidend (Charnock-Jones 2002).

Beide Prozesse, Vaskulogenese und Angiogenese, werden für die plazentare Blutgefäßversorgung benötigt (Demir et al. 2006), welche einen essentiellen Bestandteil der Plazentation darstellt, denn die Einrichtung eines plazentaren Austauschsystems mit hoher Kapazität ist essentiell für das Wachstum und Wohlergehen des Fetus (Zhang et al. 2002).

Die Neovaskularisation ist in Situationen wie der Plazentation zum Einen durch die metabolischen Ansprüche des betroffenen Gewebes straff reguliert und limitiert (Pepper 1997). Weiterhin beeinflussen verschiedene Induktoren und Stimulatoren die Angiogenese und Vaskulogenese direkt oder indirekt über Stimulation der Proliferation, Differenzierung und Migration der Endothelzellen oder respektive deren Vorläuferzellen (Hanahan und Folkman 1996; Ferrara 2004; Demir et al. 2006). Zu den Stimulatoren gehören verschiedene Wachstumsfaktoren, die aus den umliegenden Geweben freigesetzt werden. Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren in Bezug auf die Angiogenese ist der VEGF (vascular endothelial growth factor) mit seinen beiden Rezeptoren Flt-1 (fms-like tyrosine kinase, VEGFR-1) und KDR (kinase insert domain-containing region, VEGFR-2) (Ferrara 2001). Dementsprechend ist VEGF auch in die Vaskularisation der Plazenta involviert (Dantzer et al. 2000). Neben VEGF gilt auch FGF (fibroblast growth factor) als einer der Haupt-Wachstumsfaktoren der Angiogenese in der Plazenta, denn diese beiden Proteinfamilien sind möglicherweise für einen Großteil der Heparin-bindenden angiogenen Aktivität verantwortlich, die sowohl vom ovariellen als auch vom plazentaren Gewebe produziert wird (Reynolds und Redmer 2001).

Die Angiogenesefaktoren werden von den Endothelien selbst und/oder den umliegenden Geweben freigesetzt und regen daraufhin das Wachstum neuer Kapillaren an, welches in einer Kaskade von mindestens vier Schritten abläuft (Hanahan 1997): Erstens müssen die Zellen die Basallamina durchbrechen, welche ein bestehendes Blutgefäß umgibt. Dazu bilden die Endothelzellen Proteasen, welche die extrazelluläre Matrix lokal auflösen. Zweitens wandern die Endothelzellen zur Signalquelle (Chemotaxis). Drittens kommt es zur Teilung der Endothelzellen und viertens zur Kanalisierung der zunächst soliden Kapillarsprosse und der Bildung einer neuen Basallamina um das verlängerte Blutgefäß.

Letztlich wird das neue funktionsfähige Blutgefäß durch die Integration von Perizyten stabilisiert (Huynh-Do 2006), welche die Reifung und Remodellierung von Gefäßen beeinflussen (Benjamin et al. 1998). Sie umhüllen die endothelialen Kanäle und unterstützen die Aufrechterhaltung der Gefäße und haben regulierende Funktionen auf die Gefäße (Hanahan 1997).

Im Hinblick auf die Freisetzung der Angiogenese-Faktoren spielt Sauerstoffmangel eine entscheidende Rolle, da dieser zu einer Freisetzung der Faktoren im umliegenden Gewebe führt. So wiesen zum Beispiel Levy et al. (1996) nach, dass Wachstumsfaktoren wie VEGF durch Sauerstoff-Spannung reguliert werden, denn bei reduziertem Sauerstoff steigen die VEGF-A mRNA Level. In der frühen Gravidität scheint der geringe Sauerstoff-Partialdruck

einen Anstieg der lokalen VEGF-Produktion zu verursachen, welche wiederum die aktive Angiogenese, die in der sich entwickelnden Plazenta erfolgt, aufrechterhält und unterstützt (Charnock-Jones 2002).

Die Angiogenese ist ein Schlüsselereignis für die proliferativen Prozesse im Uterus und ist sowohl für die plazentare als auch die fetale Entwicklung erforderlich (Breier et al. 1992; Risau 1997; Lopes et al. 2003). Einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren, VEGF, wird im Endometrium exprimiert (Charnock-Jones et al. 1993; Smith 2001) und ist ein wichtiger Faktor in der Regulation der Ereignisse der frühen Implantation und der Schaffung der Plazenta (Matsumoto et al. 2002).

Zusätzlich zu seiner endothelialen mitogenen Kapazität kann VEGF die Flüssigkeits- und Proteinextravasation von Blutgefäßen induzieren, was zu der Bezeichnung Gefäßpermeabilitätsfaktor (vascular permeability factor) geführt hat (Rowe et al. 2003). Der Ort der Implantation ist in Nagetieren durch lokale Ödeme, erhöhte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation charakterisiert. Die Fähigkeit des Endometriums VEGF zu exprimieren macht eine Beteiligung an diesem Prozess wahrscheinlich (Charnock-Jones et al. 1993). Zudem muss der fetale Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff während der frühen Gravidität durch Diffusion über die feto-maternale Verbindung befriedigt werden, ein Prozess der in entscheidendem Maße von der Gefäßpermeabilität abhängt.

Die Angiogenese ist für eine erfolgreiche frühe Implantation und erfolgreiche Plazentation notwendig. Für die Schwangerschaft des Menschen wird die Beteiligung von mindestens drei zeitlich unterschiedlichen vaskulären Prozessen vorgeschlagen: einmal der adäquaten uterinen Angiogenese/Gefäßentwicklung zum Zeitpunkt der Implantation, zum Zweiten von der Entwicklung und Ausdehnung des Gefäßsystems der Zotten bald nach der Implantation und zum Dritten von der Remodellierung des maternalen uterinen Blutkreislaufs nahe der maternal-fetalen Berührungsfläche (Torry et al. 2004).

Tabelle 1: Faktoren mit angiogener Aktivität (nach Huynh-Do 2006)

Faktoren mit angiogener Aktivität
Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 (Ang-1 und Ang-2)
Acidic und Basic fibroblast growth factor (aFGF und bFGF)
Epidermal growth factor (EGF)
Ephrin A und Ephrin B
Placental growth factor (PlGF)

Platelet derived growth factor (PDGF)
Transforming growth factor- α (TGF- α)
Tumor necrosis factor- α (TNF- α)
Vascular endothelial growth factor (VEGF=VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E

1.3.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

1983 beschrieben Senger et al. die unvollständige Aufreinigung eines Proteins aus einer Hepatokarzinom Zelllinie des Meerschweinchens, welches eine erhöhte Gefäßpermeabilität der Haut förderte, und zwar mit einer 50.000 mal höheren Potenz als Histamin. Diesem Protein wurde der Name vascular permeability factor (VPF) gegeben. VPF ist bis heute einer der potentesten gefäßpermeabilisierenden Wirkstoffe.

Im Juni 1989 beschrieben Ferrara und Henzel die Isolation eines diffusionsfähigen endothelzellspezifischen Mitogens aus einem aufbereiteten Medium boviner hypophysärer follikulärer Zellen, welches sie, die eingeschränkte Zielzellspezifität dieses Moleküls widerspiegelnd, vascular endothelial growth factor (VEGF) nannten (Ferrara und Henzel 1989; Ribatti 2005). Anschließend berichteten Connolly et al. (1989) von der Isolation und Sequenzierung des humanen VPF von einer Hepatokarzinom Zelllinie. Im Dezember 1989 beschrieben dann beide Gruppen die komplette komplementäre DNA-Sequenz, die VEGF und VPF kodiert (Keck et al. 1989; Leung et al. 1989), und es stellte sich heraus, dass diese identisch waren (Ribatti 2005).

Neben VEGF-A (=VEGF) wurden bis heute weitere VEGF-verwandte Gene identifiziert: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und die viral kodierten VEGF-E. Sie alle gehören, zusammen mit PlGF (placenta growth factor), der VEGF/PDGF (platelet derived growth factor) Supergen Familie an.

Die vaskuläre Angiogenese wird vor allem durch VEGF-A reguliert, während die Lymphangiogenese vor allem durch VEGF-C und -D reguliert wird (Carmeliet und Collen 1999).

Funktionen von VEGF

Natives VEGF ist ein basisches, homodimerisches, heparinbindendes Glykoprotein von 40-45 kDa, welches eine spezifische mitogene Aktivität für Endothelzellen, die von Arterien, Venen und Lymphgefäßen stammen besitzt (Ferrara und Henzel 1989; Ferrara und Davis-

Smyth 1997; Neufeld et al. 1999; Ferrara und Gerber 2001) und auch bekannt unter dem Namen Vaskulotropin (Klagsbrun und D'Amore 1996). VEGF ist einer der Hauptfaktoren der Vaskulogenese und Angiogenese (Ribatti 2005), der für die Regulation vaskulärer Veränderungen verantwortlich ist (Lopes et al. 2003). VEGF wurde als erster Faktor beschrieben, der spezifisch die Proliferation der vaskulären Endothelzellen initiieren konnte (Stouffer et al. 2001). Daneben besitzt VEGF weitere Funktionen, wobei unter diesen die Induktion der Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen die bedeutendste ist (Gerber et al. 1998b).

Wie bereits erwähnt, spielt VEGF auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gefäßpermeabilität (Lopes et al. 2003), und kann die Fenestration von Endothelzellen induzieren (Roberts und Palade 1995). Außerdem bewirkt VEGF eine Vasodilatation und aktiviert die Monozytenmigration. Eine weitere Funktion von VEGF ist seine antiapoptotische Aktivität auf Endothelzellen, welche über die Phosphatidylinositol 3'-Kinase vermittelt wird (Gerber et al. 1998a; Gerber et al. 1998b). Dabei ist eine bestimmte Schwellenwert-Konzentration von VEGF erforderlich, um die Apoptose der Endothelzellen zu verhindern und die Schwellenwert-Konzentration ist zudem essentiell für die Stabilisierung der neu geformten Blutgefäße (Alon et al. 1995; Berisha et al. 2000). Damit agiert VEGF als ein Überlebensfaktor (Alon et al. 1995), der für die Aufrechterhaltung bereits differenzierter Blutgefäße erforderlich ist (Ferrara et al. 1992).

In vivo induziert VEGF also die Angiogenese sowie die Permeabilität der Blutgefäße und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Vaskulogenese (Neufeld et al. 1999). Dass VEGF das instruktive Signal für die Differenzierung der Hämangioblasten in eine endotheliale Zelllinie ist, wurde anhand von Mesodermzellen von Hühnerembryonen, basierend auf der Expression von VEGFR-2, nachgewiesen, denn in der Anwesenheit von VEGF differenzierten sich diese Zellen entlang der endothelialen Zelllinie (Eichmann et al. 1997). VEGF vermittelt also die Bildung von Endothelzellen und primitiven Blutgefäßen (Vaskulogenese) und regelt außerdem das Gefäßwachstum durch Sprießen der Endothelzellen von bereits vorhandenen Gefäßen (Angiogenese) (Risau 1997; Plate 2001). Zudem beschleunigt VEGF den Prozess der Ummantelung der Gefäße mit Perizyten, was bei Untersuchungen an VEGF-behandelten Retinagefäßen nachgewiesen wurde (Benjamin et al. 1998).

Obwohl VEGF ein potentes Mitogen für mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen ist, die von Arterien, Venen und Lymphgefäßen stammen, hat es keine beständige und merkliche mitogene Aktivität für andere Zelltypen und zeigt damit eine hohe Zielzellspezifität (Ferrara

und Davis-Smyth 1997). Die Spezifität von VEGF wird durch das Modell von in Kollagengel eingebetteten Ringen der Rattenaorta unterstrichen, da die durch VEGF induzierte Proliferation und Migration nahezu ausschließlich bei vaskulären Endothelzellen stattfindet (Nicosia et al. 1994). Die Präsenz von angiogenen Faktoren wie VEGF ermöglicht den Blutgefäßen das Wachsen und in der Abwesenheit von VEGF kommt es zu einer Regression der Blutgefäße (Hanahan 1997). Dabei wirkt VEGF in erster Linie als parakriner Mediator (Ferrara et al. 1993). Dass VEGF eine Schlüsselrolle in der Regulation der normalen und abnormalen Angiogenese inne hat (Mustonen und Alitalo 1995; Ferrara und Davis-Smyth 1997) wird auch dadurch deutlich, dass der Verlust eines einzigen VEGF Allels in embryonaler Letalität resultiert (Carmeliet et al. 1996) und unterstreicht die unersetzbare Rolle von VEGF in der Entwicklung und Differenzierung des Gefäßsystems.

Organisation des VEGF-Gens

Bisher sind sechs verschiedene VEGF Isoformen bekannt, die sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren unterscheiden (Ferrara 2001). Das VEGF-Gen besteht aus acht Exons, die durch sieben Introns voneinander abgetrennt werden, und der Kodierungsbereich umfasst in etwa 14 kb (Tischer et al. 1991). Die verschiedenen Isoformen resultieren aus der alternativen Exon-Spleißung eines einzigen Gens und bilden aktive, über Disulfidbrücken vernetzte Homodimere (Neufeld et al. 1999). Die verschiedenen Isoformen haben dieselbe Funktion, aber unterschiedliche Heparin-Bindungseigenschaften (Lopes et al. 2003).

Beim Menschen wurden fünf molekulare Isoformen von VEGF-A identifiziert (Stouffer et al. 2001). Drei davon, VEGF 121, VEGF 145 und VEGF 165 befinden sich im Zytoplasma, die zwei anderen, VEGF 189 und VEGF 206 sind membrangebunden. VEGF 165 ist die dominierende molekulare Spezies, welche von einer Vielzahl normaler und transformierter Zellen produziert wird (Ferrara und Davis-Smyth 1997). VEGF 165 ist ein über 100fach potenteres Mitogen als VEGF 121, wobei das mitogene Potential dabei von der Carboxyl-terminalen Domäne (111-165) entschieden wird (Keyt et al. 1996a). VEGF 121 ist ein lösliches Mitogen, das Heparin nicht bindet, wohingegen die längeren Isoformen von VEGF Heparin mit fortschreitend höherer Affinität binden (Keyt et al. 1996a). Außerdem ist VEGF 121 ein saures, frei diffusionsfähiges Protein. VEGF 165 wird ebenfalls sezerniert, obwohl eine signifikante Fraktion an die Zelloberfläche und die extrazelluläre Matrix gebunden bleibt. Im Gegensatz dazu sind die stark basischen Proteine VEGF 189 und VEGF 206 fast vollständig in die extrazelluläre Matrix eingebunden (Park et al. 1993; Ferrara 2001). VEGF 145 ist wahrscheinlich eine gewebespezifische Form, die speziell im

Uterusgewebe exprimiert wird (Charnock-Jones et al. 1993). Trotz der Tatsache, dass alle Mitglieder eine identische Signalsequenz haben, werden die kleineren Mitglieder der VEGF-Familie also von Zellen sezerniert und agieren vermutlich parakrin, während VEGF 189 und VEGF 206 größtenteils zellassoziiert sind und vermutlich auf autokrine Weise agieren (Ferrara et al. 1992; Berisha et al. 2000).

Bei dem murinen VEGF-Gen entstehen drei Isoformen von VEGF-A: VEGF 120, VEGF 164 und VEGF 188, die jeweils immer genau eine Aminosäure kürzer sind als die humanen VEGFs (Shima et al. 1996; Ferrara und Davis-Smyth 1997). Generell sind die humanen VEGFs in der N-terminalen Region einen Rest länger als die meisten anderen Säugetier-VEGFs (Scheidegger et al. 1999).

Die caninen Isoformen von VEGF unterscheiden sich dementsprechend in der Anzahl ihrer Aminosäuren von denen des Menschen ebenfalls um immer eine Aminosäure. VEGF 120 und VEGF 164 sind lösliche Proteine, VEGF 144 und VEGF 188 sind mit der extrazellulären Matrix und Heparansulfat-Proteoglycanen an der Zelloberfläche assoziiert und dementsprechend nicht als lösliche Liganden freigegeben und VEGF 205 liegt aufgrund seiner engen Bindung an die extrazelluläre Matrix ebenfalls in unlöslicher Form vor (Scheidegger et al. 1999). Die canine Aminosäuresequenz unterscheidet sich von der humanen VEGF Sequenz in 4,8 % veränderten Resten, was beide strukturell nahezu identisch macht (Scheidegger et al. 1999). Der einzelne Glutaminsäurerest, der an Position 5 im humanen Protein anwesend ist, fehlt beim caninen VEGF; dieselbe Deletion wurde bei allen anderen bekannten VEGFs von Säugetierspezies beobachtet. Keiner der Unterschiede ist an einer Position lokalisiert, die relevant für die biologische Aktivität von VEGF ist (Christinger et al. 1996; Muller et al. 1997; Wiesmann et al. 1997; Scheidegger et al. 1999). Ebenso ähneln die caninen VEGF Rezeptoren den humanen Rezeptoren sehr, die Struktur des caninen VEGFR-2 ist sogar mit dem des korrespondierenden humanen Rezeptors identisch (Scheidegger et al. 1999). Nicht nur die Molekularbiologie, auch die Funktion des VEGF Signalsystems sind in Menschen und Hunden nahezu identisch, da die caninen VEGFs die selben Zellbindungseigenschaften wie die humanen VEGFs zeigen (Scheidegger et al. 1999). Die Transkription von VEGF und vielen anderen angiogenetischen Molekülen wird von dem Transkriptionsfaktor HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) reguliert, der, wie sein Name besagt, durch Gewebehypoxie induziert wird (Huynh-Do 2006).

Das VEGF-Protein ist für die Endothelzellen auf zwei Wegen verfügbar: als frei diffusionsfähige Proteine oder nach Protease-Aktivierung und Spaltung der längeren Isoformen, die an die extrazelluläre Matrix gebunden sind (Lopes et al. 2003).

Die Bindung der VEGF-Isoformen an die Zelloberfläche und die extrazelluläre Matrix erfolgt durch Interaktionen mit Heparinsulfatproteoglykanen und reflektiert die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der VEGF-Isoformen (Klagsbrun und D'Amore 1996).

Zwischen der Heparinaffinität und der Diffusionsfähigkeit besteht eine inverse Beziehung, und die Heparin-Bindungs Domäne ist wichtig für die biologische Aktivität (Ferrara 2001).

Regulation der VEGF-Genexpression

Es wurden verschiedene Mechanismen nachgewiesen, die an der Regulation der VEGF-Gen-Expression partizipieren. Darunter spielt die Sauerstoff-Spannung sowohl in vitro als auch in vivo eine Hauptrolle. Die Expression von VEGF-mRNA in einer Vielzahl von normalen und transformierten Zellkultur-Typen ist schnell und reversibel zu induzieren, indem sie einer geringen Sauerstoff-Spannung ausgesetzt werden (Ferrara und Davis-Smyth 1997). Ebenso wird die VEGF-Expression durch Hypoglykämie induziert (Shweiki et al. 1995).

Des Weiteren verursachen verschiedene Zytokine oder Wachstumsfaktoren die Hochregulation der VEGF-mRNA-Expression oder induzieren die Freisetzung des VEGF-Proteins. Dazu gehören zum Beispiel der epidermal growth factor, der keratinocyte growth factor, TGF- α und TGF- β (transforming growth factor- α und - β), die zur Induktion der VEGF mRNA-Expression führen. VEGF fungiert dementsprechend eventuell als parakriner Mediator für indirekte angiogene Vertreter wie TGF- β . Auch IL-1 α , IL-1 β und PGE₂ induzieren die VEGF-Expression (Ferrara und Davis-Smyth 1997), ebenso PDGF (Taniguchi et al. 2001).

Ebenfalls zur Hochregulierung von VEGF kommt es unter dem Einfluss von ovariellen Steroidhormonen und Prostaglandinen (Lopes et al. 2003). Progesteron zum Beispiel stimuliert die Angiogenese, VEGF und VEGFR-2, während Östrogen bei Untersuchungen am Mäuseuterus zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führt (Ma et al. 2001). Sowohl durch Östrogen- als auch durch Progesteronbehandlung wird die VEGF-Expression im Uterus von Ratte, Schaf und Mensch hochreguliert (Hildebrandt et al. 2001; Sugino et al. 2002).

VEGF selbst kann die Hochregulierung seines Rezeptors VEGFR-2 induzieren (Weston et al. 2002).

VEGF-verwandte Moleküle

Es gibt drei VEGF-ähnliche Moleküle, deren Strukturhomologie zu VEGF darauf hinweist, dass sie ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des Blutgefäßwachstums spielen. Dies sind PlGF, VEGF-B und VEGF-C/VRP (VEGF-related protein).

Das PlGF-Homodimer zeigt nur eine minimale direkte mitogene Aktivität auf Endothelzellen, aber PlGF kann ebenfalls Heterodimere mit VEGF bilden. Die Formation solcher Heterodimere stellt eventuell einen Mechanismus der negativen Regulation der VEGF-Bioaktivität dar, durch eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zu weniger potenten Molekülen (Cao et al. 1996). Andere Autoren beschreiben jedoch, dass diese Heterodimere die Bioaktivität von geringen, marginal wirksamen VEGF-Konzentrationen sowohl auf das Endothelzellwachstum als auch auf die Gefäßpermeabilität signifikant potenzieren können (Park et al. 1994; Ribatti 2005). In vitro Untersuchungen zeigten, dass aufgrund der Zugabe von PlGF die Wirksamkeit von VEGF um das fünf- bis zehnfache ansteigt (Mac und Popel 2004).

PlGF weist eine 53%ige Sequenzhomologie der Aminosäuren zu der PDGF-ähnlichen Region von VEGF auf (Barleon et al. 1994; Cao et al. 1996; Klagsbrun und D'Amore 1996).

Ebenso wie die langen Isoformen von VEGF wird VEGF-B als membrangebundenes Protein exprimiert, das nach der Addition von Heparin als lösliche Form freigegeben wird. VEGF-B kann mit VEGF Heterodimere formen, wenn sie koexprimiert werden, was zu der Hypothese führt, dass VEGF-B in der Regulation der Angiogenese partizipiert (Olofsson et al. 1996a; Olofsson et al. 1996b). Zum Beispiel stimuliert VEGF-B das Wachstum humaner und boviner vaskulärer Endothelzellen (Olofsson et al. 1996a). Der Beweis des proangiogenen Effekts von VEGF-B wurde in einem Maus-Model mit chirurgisch induzierter Hinterbein-Ischämie bestätigt (Silvestre et al. 2003).

VEGF-C wird in Wachtel- und Hühnerembryonen vor allem in Regionen beobachtet, die in der späteren Entwicklung reich an lymphatischen Endothelien sind (Eichmann et al. 1998). Zudem stimuliert VEGF-C/VRP (VEGF-related protein) das Wachstum humaner Endothelzellen der Lunge (Lee et al. 1996). An VEGF-C Knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass VEGF-C der für die Lymphangiogenese essentielle parakrine Faktor ist (Karkkainen et al. 2004).

1.3.2 VEGF-Rezeptor-1 und VEGF-Rezeptor-2

Allgemeines und Funktionen

Seine biologischen Effekte übt VEGF vor allem durch die Bindung an seine transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptoren aus, darunter fallen der VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) und VEGFR-3 (Flt-4) (Kaipainen et al. 1995). Sowohl Flt-1 als auch KDR binden VEGF mit hoher Affinität. Flk-1 (fetal liver kinase 1) ist das murine Homolog zum

humanen KDR und besitzt eine 85%ige Sequenzidentität zu diesem (Matthews et al. 1991). VEGFR-1 und VEGFR-2 werden in erster Linie, aber nicht ausschließlich, von vaskulären Endothelzellen exprimiert. VEGFR-2 scheint der Haupt-Signalrezeptor für vaskuläre Endothelzellen zu sein, wohingegen VEGFR-1 wichtig für die Migration ist und vermutlich als „Köder“-Rezeptor fungiert, der der Regulation der Bioverfügbarkeit von VEGF in einem gegebenen Gewebe dient (Risau 1997; Clauss 1998). So zeigen Endothelzellen der Aorta des Schweins, denen VEGF-Rezeptoren fehlen, Chemotaxis und Mitogenese als Antwort auf VEGF, wenn sie mit VEGFR-2-kodierendem Plasmid transfiziert werden. Im Gegensatz dazu fehlt bei transfizierten Zellen, die VEGFR-1 exprimieren, eine derartige Antwort (Waltenberger et al. 1994). Außerdem bindet VEGFR-1 mit hoher Affinität den placenta growth factor (PlGF), ein Protein, das mit VEGF eng verwandt ist, und nur in einer begrenzten Gruppe von Geweben wie der Plazenta exprimiert wird (Sawano et al. 1996; Vuorela et al. 1997). PlGF bindet aber nicht an VEGFR-2, und dementsprechend fehlen direkte mitogene oder permeabilitätssteigernde Eigenschaften oder die Möglichkeit, die Tyrosinphosphorylierung in Endothelzellen effektiv zu stimulieren (Park et al. 1994). Demzufolge sind Interaktionen mit VEGFR-2 eine entscheidende Voraussetzung, das volle Spektrum der biologischen VEGF-Antworten zu induzieren.

VEGFR-2 kommt vor allem als ein Signalfaktor in Endothelzellen vor und ist der erste bekannte endotheliale Rezeptor, der im primitiven Mesoderm und in Vorläufern der Angioblasten exprimiert wird (Yamaguchi et al. 1993; Breier et al. 1997; Kappel et al. 1999; Dantzer et al. 2000). VEGFR-2 ist in Endothelzell-Vorläufern schon in den frühesten embryonalen Entwicklungsstadien präsent (Quinn et al. 1993). Mäuse, die homozygot Flk-1-defekt sind, zeigen eine gestörte Hämatopoese, was darauf hinweist, dass die Flk-1 Aktivität essentiell für die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläufer ist (Kappel et al. 1999). VEGFR-1 fungiert über NO als ein Negativregulator der VEGFR-2 Wirkung und inhibiert so das Wachstum der Endothelzellen bei gleichzeitiger Förderung der Differenzierung von Endothelzellen zu Gefäßtubuli (Bussolati et al. 2001). Zudem wurde an Knockout-Mäusen gezeigt, dass VEGFR-1 ein übermäßiges Wachstum von endothelialen Populationen verhindert. In der Vaskulogenese ist die primäre Rolle von VEGFR-1 die Limitierung der Differenzierung von Hämangioblasten in Endothelzellen (Fong et al. 1995; Fong et al. 1999). Der Verlust der VEGFR-1 Aktivität resultiert in einer Akkumulation von Endothelzellen und einer dramatischen Abnahme der Zahl der Kapillarverbindungen, die durch die Zugabe von NO wieder hergestellt werden können. Die Inhibition von VEGFR-1 in einem Matrigel-

Angiogenese Assay induziert große, Aneurysma-ähnliche Strukturen, was die regulatorische Rolle von VEGFR-1 in der Gefäßformation bestätigt (Bussolati et al. 2001).

Die Aktivierung von VEGFR-2 wird mit VEGF-induzierter Mitogenität und Angiogenese in Verbindung gebracht (Ferrara und Davis-Smyth 1997), da diese die Differenzierung, Proliferation und Migration von Endothelzellen induziert (Bernatchez et al. 1999) und anti-apoptotisch und permeabilitätssteigernd wirkt (Zygmunt et al. 2003). Im Gegensatz dazu wird die Erhaltung und Überlebensfunktion von VEGF mit VEGFR-1 assoziiert, und die Bindung an VEGFR-1 vermittelt die Endothelzell-Interaktion und Tubulusformation (Fong et al. 1995). Dementsprechend wird die VEGFR-1 mRNA vor allem im ruhenden Endothel exprimiert (Peters et al. 1993), während VEGFR-2 in erster Linie in proliferierenden Gefäßen exprimiert wird (Quinn et al. 1993).

VEGFR-1 hat eine zehnfach höhere Bindungsaffinität für VEGF als VEGFR-2, aber eine viel schwächere Tyrosinkinase-Aktivität, was auf eine Funktion als negativer Regulator der VEGF-Signalwirkung schließen lässt (Hornig und Weich 1999). VEGFR-1 könnte als ein wachstumssuppressiver Rezeptor fungieren, um der proliferativen Wirkung von VEGFR-2 entgegenzuwirken (Ahmed et al. 1997). Auch Ferrara (2001a) sieht in ihm in erster Linie keinen Signalrezeptor, sondern einen „Köder“-Rezeptor, der die Wirksamkeit von VEGF auf das Gefäßendothel auf negative Weise regulieren kann, da VEGF gebunden wird und somit für die Bindung von VEGFR-2 nicht mehr zur Verfügung steht. Im Gegensatz zu VEGFR-1 besitzt VEGFR-2 eine geringere Bindungsaffinität aber eine hohe Aktivität (Sawano et al. 1996; Norrby 1997). Eine weitere Rolle von VEGFR-1 ist die durch ihn vermittelte Monozytenmigration als Antwort auf VEGF (Barleon et al. 1996).

VEGFR-3 ist ein 180 kDa großes Glykoprotein und hat einen hohen Grad an Aminosäuren-Sequenzhomologie mit Flt-1 und Flk-1/KDR (Klagsbrun und D'Amore 1996), wird aber vor allem in lymphatischen Gefäßen während der Entwicklung exprimiert und besitzt eine wichtige Funktion in der Lymphangiogenese (Plate 2001). Weiterhin scheint VEGFR-3 ein Ko-Rezeptor für VEGFR-2 zu sein, der die VEGFR-2 vermittelte chemotaktische und mitogene Aktivität erhöht (Soker et al. 1998).

VEGFR-1 ist der Rezeptor für VEGF, PlGF und VEGF-B (Ferrara und Davis-Smyth 1997; Olofsson et al. 1998). Die Liganden für VEGFR-2 sind VEGF, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E, wohingegen VEGFR-3 nur VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D bindet (Joukov et al. 1996; Achen et al. 1998; Hornig und Weich 1999; Meyer et al. 1999; Olofsson et al. 1999).

sVEGFR-1

Des weiteren gibt es eine natürlich vorkommende lösliche Form von VEGFR-1 (sVEGFR-1, sFlt-1), welche aus dem Überstand humaner Endothelzellen der Nabelvene isoliert wurde und 1993 erstmals von Kendall and Thomas beschrieben wurde (Kendall und Thomas 1993; Kendall et al. 1996). Auch sVEGFR-1 bindet VEGF mit hoher Affinität und kann daher die VEGF-induzierte Mitogenität verhindern. Vermutlich dient er als ein „Köder“-Rezeptor um die VEGF-Verfügbarkeit zu reduzieren, und verhindert so ein übermäßiges Wachstum der Endothelzellen in das Gefäßlumen. Außerdem neutralisiert er in die Blutbahn abgegebenes aktives VEGF. In der Plazenta sezernierter sVEGFR-1 wird in die maternale Zirkulation abgegeben, wo es VEGF bindet und dadurch seinen antagonistischen Effekt ausübt (Clark et al. 1998b). Die Präsenz eines solchen Antagonisten weist darauf hin, dass die Regulation der VEGF-Aktion essentiell für eine erfolgreiche Gravidität ist (Clark et al. 1998a). Darüber hinaus vermuteten Kendall et al. (1996), dass sVEGFR-1 heterodimere Komplexe mit VEGFR-2 bilden kann, die möglicherweise einen dominant-negativen Effekt auf die VEGFR-2-Signaltransduktion ausüben können. Die VEGF Signaltransduktion findet also nicht nur durch Homodimere zwischen Rezeptoren mit voller Länge statt, sondern auch durch Rezeptor-Heterodimere (Kendall et al. 1996). Hohe sVEGFR-1 Werte wurden in Serum und im Fruchtwasser des Menschen als Gestations-assoziiertes Faktor nachgewiesen (Banks et al. 1998; Hornig und Weich 1999). Die VEGFR-1 pre-mRNA kann unterschiedlich gespleißt werden, was in zwei Formen resultiert, einmal in der membrangebundenen Form mit voller Länge (VEGFR-1) und zum Zweiten in der löslichen, verkürzten Form (sVEGFR-1), welche die extrazelluläre VEGF-Bindungs Ig Domäne enthält, der aber das Transmembransegment und die Kinase Domäne fehlen (He et al. 1999; Scheidegger et al. 1999). Die sVEGFR-1 kodierende mRNA ist in vielen Endothelzellen detektierbar und wird im Trophoblasten des Menschen stark exprimiert (Charnock-Jones 2002; Li et al. 2005). sVEGFR-1 hat eine Größe von ungefähr 110 kDa.

Damit ist sVEGFR-1 ein endogenes Fragment eines Rezeptors, der normalerweise die Angiogenese positiv beeinflusst, aber in dieser Form die Ligandenbindung verhindert und somit zu einem potenten VEGF-Antagonist wird (He et al. 1999; Hornig und Weich 1999).

Tyrosinkinase-Rezeptoren

Bei den VEGF-Rezeptoren 1 und 2 handelt es sich um Transmembranproteine mit Tyrosinspezifischer Proteinkinaseaktivität, und zwar um Tyrosinkinase-Rezeptoren vom Typ III (Cunningham et al. 1999), die sich nach Bindung des Liganden zu Dimeren zusammenlagern

und mittels Autophosphorylierung eine intrazelluläre Signalkaskade einleiten, die über eine Konformationsänderung einer einzigen α -helikalen Transmembrandomäne vermittelt wird (Neufeld et al. 1999). Die autophosphorylierten Tyrosinreste dienen als hochaffine Bindestellen für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine der Zielzelle und jedes dieser Proteine bindet an einen anderen phosphorylierten Tyrosinrest des aktivierten Rezeptors.

Beide Rezeptoren sind glykosiliert; im Fall von VEGFR-2 ist nur die finale glykosilierte Form fähig, als Antwort auf VEGF eine Autophosphorylierung durchzumachen (Takahashi und Shibuya 1997). Im Gegensatz dazu ist bei VEGFR-1 eine Rezeptor-Glykosilierung nicht essentiell für die hochaffine Bindung von VEGF (Barleon et al. 1997).

Aufbau der Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2

Sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2 haben sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen in der extrazellulären Domäne, eine einzelne Transmembran-Region und eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Sequenz, die von einem Insert (kinase-insert domain) unterbrochen wird (Matthews et al. 1991; Quinn et al. 1993; Ferrara und Davis-Smyth 1997). Die cDNA, die die alternativ gespleißte lösliche Form von Flt-1 (sFlt-1) kodiert, wurde in humanen Endothelzellen der Nabelvenen identifiziert. Dieser Form fehlt die siebte Immunglobulin-ähnliche Domäne, die Transmembransequenz und die zytoplasmatische Domäne (Kendall und Thomas 1993; Kendall et al. 1996).

Durch die Herstellung löslicher Mutanten der extrazellulären Domäne von Flt-1 stellte sich heraus, dass die ersten drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen für die Erkennung von VEGF verantwortlich sind (Davis-Smyth et al. 1996; Barleon et al. 1997).

Die zweite Immunglobulin-ähnliche Domäne beinhaltet die wichtigsten Determinanten für die Bindung und die Ligand-Spezifität in den VEGF-Rezeptoren. Nach Bindung des Liganden ist sie zudem imstande, eine Signaltransduktionskaskade einzuleiten. Eine Deletion der zweiten Immunglobulin-ähnlichen Domäne verhindert die Bindung von VEGF völlig (Davis-Smyth et al. 1996; Ferrara und Davis-Smyth 1997). Die dritte Immunglobulin-ähnliche Domäne ist ebenfalls notwendig für die hochaffine Bindung der Liganden an den löslichen Rezeptor und die vierte Domäne wird für die VEGF-vermittelte Rezeptor-Dimerisation benötigt (Barleon et al. 1997; Hornig und Weich 1999). In KDR (Kinase insert domain-containing region) scheint die dritte Immunglobulin-ähnliche Domäne auch eine Rolle in der Verhinderung der Bindung von PlGF an KDR zu spielen, während VEGF an KDR binden kann (Davis-Smyth et al. 1998).

Die zweite Immunglobulin-ähnliche Domäne zeigt eine überwiegend hydrophobe Interaktion mit den Polen des VEGF-Dimers (Wiesmann et al. 1997); VEGF besitzt an seiner Bindungsstelle fünf hydrophobe Reste (Davis-Smyth et al. 1998).

Allgemein liegt die Molekularmasse von Flt-1 bei einer Größe von 180 kDa, die von Flk-1/KDR bei einer Größe von 200 kDa (Klagsbrun und D'Amore 1996). Studien an fetalen und adulten Gewebeschnitten der Ratte zeigten, dass die hoch-affinen VEGF-Bindungsstellen in situ im vaskulären Endothel der großen und kleinen Gefäße lokalisiert sind. Interessanterweise wurde VEGF nicht nur von proliferierenden, sondern auch von ruhenden Endothelzellen gebunden (Jakeman et al. 1992; Jakeman et al. 1993). Die erste entwicklungsgemäße Identifikation einer hoch-affinen VEGF-Bindung war in den Hämangioblasten der Blutinseln des Dottersacks, was darauf hinweist, dass die Expression der VEGF-Rezeptoren eines der frühesten Ereignisse in der endothelialen Zelldifferenzierung ist (Jakeman et al. 1993; Ferrara und Davis-Smyth 1997).

Regulation/Steuerung

Das Gefäßendothel ist das Hauptziel der VEGF-Aktion. Die Expression der VEGFR-1- und VEGFR-2-Gene ist größtenteils auf das vaskuläre Endothel beschränkt. Die Promotor-Region von VEGFR-1 wurde geklont und charakterisiert und ein 1-kb Fragment der 5'-flankierenden Region, die essentiell für die Endothel-spezifische Expression ist, wurde identifiziert (Morishita et al. 1995). Gleichmaßen wurde im Promotor von VEGFR-2 eine 4-kb 5'-flankierende Sequenz, die die endotheliale zellspezifische Aktivierung gewährt, identifiziert (Patterson et al. 1995).

Ebenso wie bei VEGF scheint der Sauerstoffpartialdruck auch in der Regulation der VEGF-Rezeptor-Genexpression eine wichtige Rolle zu spielen. So führte eine akute oder chronische Hypoxie zu einer ausgeprägten Hochregulation der VEGFR-1- und VEGFR-2-Gene im Gefäßsystem der Lunge von Ratten (Tuder et al. 1995) und in der humanen Plazenta resultierte Hypoxie/Ischämie in einer erhöhten Expression von VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 und sVEGFR-1 (Kumazaki et al. 2002; Li et al. 2005). Die Transkription von VEGFR-2 wird von dem Transkriptionsfaktor HIF-2 α (hypoxia-inducible factor-2 α) reguliert (Kappel et al. 1999).

Mehrere natürlich vorkommende Proteine, wie zum Beispiel Angiostatin und Endostatin, hemmen die Angiogenese oder wirken als Antagonisten des VEGF-Rezeptors (O'Reilly et al. 1997). Diese natürlich vorkommenden Angiogeneseinhibitoren sind überwiegend

Spaltprodukte größerer Proteine, die selbst keine antiangiogenetische Wirkung besitzen. Viele dieser Proteine sind Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen XVIII, Thrombospondin) oder gehören zum Gerinnungssystem (Plasminogen, Antithrombin III). Die endogenen Inhibitoren werden zum Teil durch die Wirkung von Proteasen aus den Vorläuferproteinen freigesetzt. So ist Angiostatin ein 38-kD-Fragment des Plasminogens und Endostatin ein 20-kD-Fragment des C-Term Fragments des Typ- XVIII-Kollagens (Sage 1997; Huynh-Do 2006). Angiostatin beispielsweise hat eine starke antiproliferative Wirkung auf Endothelzellen (Zygmunt et al. 2003).

VEGF-Determinanten für die Flt-1 und KDR-Bindung

Die bindungsvermittelnden Determinanten von VEGF, die die Bindung an VEGFR-1 und VEGFR-2 vermitteln, wurden mittels einer zielgerichteten Mutagenese lokalisiert (Keyt et al. 1996a; Ferrara und Davis-Smyth 1997). Dabei stellte sich heraus, dass Arginin⁸², Lysin⁸⁴ und Histidin⁸⁶, die in einer Haarnadel-Schleife angeordnet sind, entscheidend für die Bindung an KDR sind, während negativ geladene Reste wie Asparagin⁶³, Glutamin⁶⁴ und Glutamin⁶⁷ in erster Linie für die Flt-1-Bindung verantwortlich sind. Diese Bindungsdomänen sind an gegenüberliegenden Enden des VEGF-Monomers lokalisiert. Im reifen VEGF-Dimer sind die Monomere in einer überschlägigen „Kopf-zu-Schwanz“ Art und Weise (mit einer großen Überschneidung) über zwei Disulfidbrücken verbunden und formen ein antiparalleles Homodimer, so dass sich die Haupt-VEGFR-2-Bindungsdomänen an den gegenüberliegenden Enden des Moleküls als die Haupt-VEGFR-1-Bindungsdomänen befinden (Keyt et al. 1996b; Muller et al. 1997; Neufeld et al. 1999). Hierbei formiert sich ein Überschneidungsbereich, mit dem beide VEGF-Rezeptoren interagieren (Wiesmann et al. 1997; Neufeld et al. 1999).

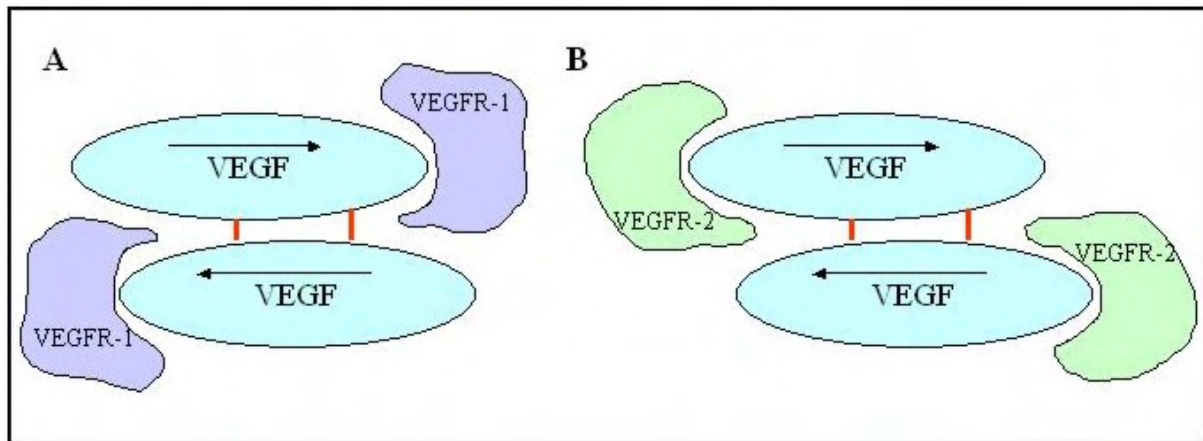


Abbildung 1: Die Interaktionen von VEGF mit seinen Signal übertragenden Tyrosinkinase-Rezeptoren. A: Interaktionen von VEGF mit den Bindungsstellen von VEGFR-1; B: Interaktionen von VEGF mit den Bindungsstellen von VEGFR-2. Das antiparallele VEGF-Homodimer ist über Disulfidbrücken (orange) verbunden. Die Hauptgruppen der VEGF Aminosäuren, die VEGFR-1 binden, sind an einem Ende des VEGF-Monomers (A) lokalisiert, die Hauptgruppen der VEGF Aminosäuren, die VEGFR-2 binden, sind am gegenüberliegenden Pol des VEGF-Monomers (B) lokalisiert (modifiziert nach Neufeld et al. 1999).

Gen Knockout-Studien

Studien an Knockout-Mäusen zeigten, dass sowohl Flt-1 als auch Flk-1/KDR essentiell für die normale Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems sind. So kam es beispielsweise zum intrauterinen Fruchtod von Mäuseembryonen zwischen Tag 8,5 p.c. und Tag 9,5 p.c., die homozygot für eine Zielmutation im Flt-1-Lokus waren (Fong et al. 1995). Endothelzellen entwickelten sich sowohl in embryonalen als auch in extraembryonalen Gebieten, waren aber nicht imstande, sich in normale Gefäßkanäle zu organisieren, was darauf schließen lässt, dass Flt-1 essentiell für die Organisation des embryonalen Gefäßsystems ist, nicht aber für die Endothelzell-Differenzierung (Klagsbrun und D'Amore 1996). Es zeigte sich, dass der primäre Defekt in VEGFR-1 Knockout-Mäusen in einer erhöhten Anzahl endothelialer Vorläuferzellen besteht, wohingegen die Formation disorganisierter Gefäßkanäle ein sekundärer Effekt ist (Fong et al. 1999). Inaktivierung des Flk-1-Gens von Mäusen führte zu einem Ausbleiben der Vaskulogenese und der Entwicklung von Blutinseln, was zum intrauterinen Tod zwischen Tag 8,5 p.c. und Tag 9,5 p.c. führte (Shalaby et al. 1995). Die Inaktivierung des VEGF-Gens in Mäusen resultierte in der embryonalen Letalität der heterozygoten Embryos zwischen Tag 11 p.c. und 12 p.c., welche möglicherweise mit dramatischen kardiovaskulären Defekten der Embryonen assoziiert sind.

Heterozygote VEGF-Gen Knockout-Mäuseembryos, die VEGF zwar exprimieren, aber auf einem reduzierten Level, weisen die gleichen Defekte in fetaler und plazentarer Angiogenese

auf wie homozygote VEGF-Gen Knockout-Mäuse. Daraus wurde geschlossen, dass VEGF einen Schwellenwert erreichen muss, damit eine normale Gefäßentwicklung stattfinden kann (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996).

Zudem erzeugten Carmeliet et al. (1999) eine Knockout-Maus, die ausschließlich VEGF 120 exprimiert. Fünfzig Prozent dieser Mäuse starben kurz nach der Geburt, die Überlebenden zeigten eine beeinträchtigte myokardiale Kontraktilität, Herzvergrößerungen, defekte Angiogenese und ischämischer Kardiomyopathie und starben innerhalb der folgenden zwei Wochen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Wirkung der heparinbindenden VEGF-Isoformen nicht durch VEGF 120 ersetzt werden kann (Carmeliet et al. 1999). Nicht nur VEGF Defizite sind letal, auch ein VEGF Überschuss kann zu Defekten führen. Gaben von rekombinantem VEGF an trächtige Mäuse führten zu einem Anstieg der Resorptionsfrequenz, einem Abfall des Embryonalgewichts sowie Plazentahämorrhagien. Dementsprechend ist das Niveau von bioaktivem VEGF von entscheidender Wichtigkeit in der Regulation des Gefäßwachstums und der Funktion während embryonaler und plazentarer Entwicklung (He et al. 1999; Charnock-Jones 2002).

Weitere Bindungsstellen

Als weitere spezifische Bindungsstellen für VEGF-A Subtypen wurden die Rezeptoren NP-1 und NP-2 (neutrophil-derived platelet activator-spezifische transmembranäre Typ I und II Rezeptoren) nachgewiesen. NP-1 ist ein Isoform-spezifischer VEGF-Rezeptor und bindet VEGF 165 (Soker et al. 1998), NP-2 bindet VEGF 165 und VEGF 145 (Stouffer et al. 2001). Dabei fungiert NP-1 als ein Ko-Rezeptor von VEGFR-2 (Neufeld et al. 1999), und wenn sie in Zellen koexprimiert werden, verbessert NP-1 die Bindung von VEGF 165 an VEGFR-2 und die VEGF 165-vermittelte Chemotaxis. Umgekehrt führt eine Blockierung der Bindung von VEGF 165 an NP-1 dazu, dass die Bindung an VEGFR-2 ebenfalls verhindert wird und dadurch die mitogene Aktivität auf Endothelzellen. NP-1 präsentiert VEGFR-2 VEGF 165 auf eine Weise, die die Effektivität der KDR-vermittelten Signaltransduktion erhöht (Ferrara 2001; Ferrara und Gerber 2001).

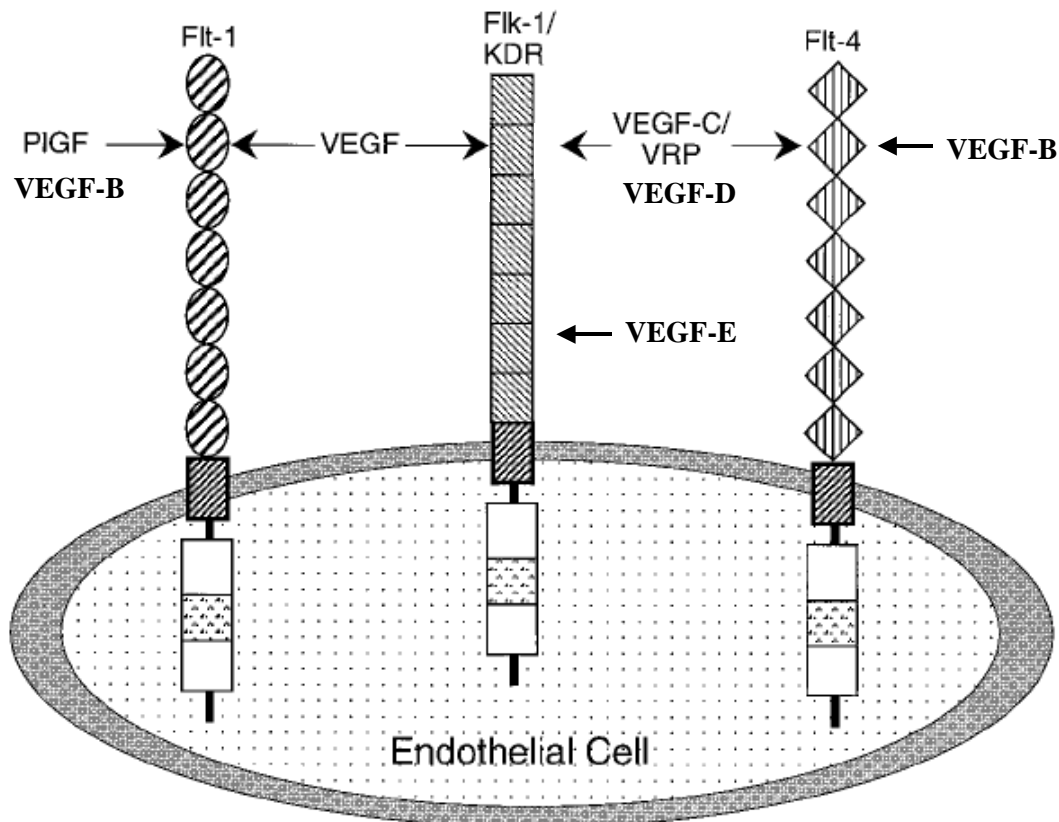


Abbildung 2: Das Diagramm illustriert die Interaktionen von VEGF und VEGF-ähnlichen Molekülen mit den drei bekannten Mitgliedern der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren mit sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen in der extrazellulären Domäne. VEGF interagiert mit Flt-1 und KDR; PIGF bindet nur Flt-1 und VEGF-C/VRP bindet mit hoher Affinität an Flt-4. VEGF-B bindet an Flt-1 und Flt-4, VEGF-D interagiert mit Flk-1 und Flt-4 und VEGF-E bindet lediglich an Flk-1(modifiziert nach Ferrara, Davis-Smyth 1997).

1.3.3 Bedeutung des vascular endothelial growth factor (VEGF) für die plazentare Angiogenese

Bei der plazentaren Neovaskularisation handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der durch einen initialen dramatischen Gefäßanstieg durch Angiogenese auf der maternalen Seite und Vaskulogenese auf der fetalen Seite gekennzeichnet ist (Risau 1997). VEGF und seine Rezeptoren wurden bereits in verschiedenen Plazentationstypen nachgewiesen und mit Angiogenese und Trophoblastinvasion in Zusammenhang gebracht (Clark et al. 1996; Das et al. 1997; Watanabe et al. 1998; Winther et al. 1999a; Yi et al. 1999; Bogic et al. 2001; Charnock-Jones et al. 2001; Winther und Dantzer 2001; Pfarrer et al. 2006). Die Angiogenese ist ein Schlüsselereignis für alle proliferativen Prozesse im Uterus und wird sowohl für die plazentare als auch fetale Entwicklung benötigt. Diese essentielle Bedeutung wurde in

Studien mit Knockout-Mäusen (Carmeliet et al. 1996) sowie an Plazenten von in vitro produzierten oder aus somatischen Zellen geklonten Feten demonstriert (Hill et al. 2000). Hier ist von Interesse, dass bei Spezies und Rassen mit einer besonders großen Zahl von Embryonen beziehungsweise Feten eine erhöhte Vaskularisierung des Endometriums beobachtet wird (Biensen et al. 1998). Zum Beispiel sind bei Ferkeln, die auf plazentare Effizienz selektiert werden, die mRNA Gehalte für VEGF und VEGFR-1 erhöht und der Durchmesser der plazentaren Blutgefäße vergrößert (Vonnahme und Ford 2004). VEGF und seine Rezeptoren sind in der Plazenta nicht nur in Endothelzellen, sondern z.B. beim Nerz auch im Epithel des Endometriums und der Drüsen sowie im Trophoblasten lokalisiert (Winther und Dantzer 2001). VEGF wirkt dabei auto- und/oder parakrin auf die Endothelzellen und regt das Gefäßwachstum in der Plazenta an. In einer Studie der Arbeitsgruppe wurden VEGF und seine Rezeptoren während der eingeschränkten Trophoblastinvasion des Rindes demonstriert (Pfarrer et al. 2006). Die Bedeutung einer funktionierenden, adäquaten Nährstoff- und Substratversorgung für die normale intrauterine Entwicklung des Fetus und die Auswirkungen einer gestörten uterinen Blutzufuhr (erhöhte perinatale Morbidität und Mortalität) wurde unter anderem in vorangegangenen Arbeiten im Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums gezeigt (Zygmunt et al. 2003).

Aus der Gruppe der Fleischfresser wurde bislang nur der Nerz untersucht. Lopes et al. (2003) haben die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren Flt-1 und KDR während der Periimplantationsperiode im Nerz studiert, einer Spezies, die physiologisch eine verzögerte Implantation (embryonale Diapause) aufweist. Die Untersuchungen zeigten die höchste mRNA Expression der VEGF-Isoformen 120, 164 und 188 während der späten embryonalen Aktivität und der Implantation. Das VEGF-Protein war im Drüsenepithel in allen Phasen der Implantation vorhanden, während es im luminalen Epithel während der Diapause fehlte. Der invasive Trophoblast des implantierten Embryos zeigte eine besonders intensive Immunreaktion. Der hohe Gehalt an VEGF mRNA in pseudograviden Uteri weist darauf hin, dass die VEGF-Hochregulierung während der Implantation eher von maternalen als von fetalen Faktoren abhängt. Ebenso steigt das Vorkommen der VEGF Rezeptoren Flt-1 und KDR im Uterus während der Implantation, nicht aber in den Uteri pseudogravider Tiere. Dieses deutet darauf hin, dass der Embryo in der Lage ist, die Rezeptorexpression zu regulieren. Die räumlich und zeitlich regulierte Kolo-kalisation von VEGF und Flt-1 sowie VEGF und KDR in der definitiven Plazenta des Nerzes lässt auf unterschiedliche Funktionen der Rezeptoren schließen und die Anwesenheit in Nicht-Endothelzellen unterstellt weitere

Funktionen des VEGF Systems, besonders im Hinblick auf Zelldifferenzierung und Gefäßpermeabilität (Winther und Dantzer 2001).

1.4 Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) und seinen Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und KDR (VEGFR-2) in der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze nachzuweisen. Durch den Zuchtfortschritt und den zunehmenden Einsatz von neuen Techniken der Reproduktion wird die detaillierte Kenntnis der physiologischen Verhältnisse in der Trächtigkeit bei Hund und Katze immer interessanter. Aus ethischen Gründen sind Materialentnahmen aber nur selten zu vertreten. Da sich die Plazenten in anatomisch-histologischer Hinsicht vom häufig untersuchten, nahe verwandten Nerz unterscheiden, sind die Ergebnisse der Studien zum Nerz nur eingeschränkt auf den Hund und die Katze zu übertragen. Die Forschungsarbeit soll über den Zusammenhang von Vaskularisierung, VEGF Expression und dessen Rolle in der placentaren Angiogenese der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze Aufschluss geben. Von besonderem Interesse sind weiterhin das Invasionsverhalten der Trophoblastzellen und die Charakterisierung der Deziduazellen.

Hierfür sollen VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden, und zwar mit Hilfe der Immunhistochemie und dem Western Blot im ersten Schritt sowie der RT-PCR, Real Time RT-PCR und in situ Hybridisierung im zweiten Schritt. Erforderliche Vorarbeiten umfassen die immunhistochemische Identifikation der unterschiedlichen Zellpopulationen und der Invasionsstadien mit Markern für zytoskeletale Filamente.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die untersuchten Plazenten stammen von insgesamt 23 Katzen und 43 Hunden. Die Plazenten wurden im Rahmen von Kastrationen gesunder, trächtiger Tiere entnommen. Dabei wurde ein Teil der Kastrationen in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Giessen (KGGA Giessen) durchgeführt, einige Kastrationen erfolgten in der Tierärztlichen Praxis Dr. med. vet. U. Linzer in Koblenz und der Großteil des durch Kastrationen gewonnenen Materials stammt aus der Clinica Veterinària S.M. in Faro, Portugal.

Des weiteren war ein Teil des Materials bereits im Institut für Veterinäranatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Giessen vorhanden und ein weiterer Teil der in Paraffin eingebetteten Gewebeproben stammt aus der Universität von São Paulo, Brasilien. Das Graviditätsstadium war bei einem Teil der Tiere bekannt, in den meisten Fällen wurde dieses anhand des Entwicklungsstadiums der Feten und der histologischen Gewebeuntersuchung ermittelt. Die Einteilung des Graviditätsstadiums erfolgte in drei Kategorien: erstes Drittel, zweites Drittel und letztes Drittel der Gravidität.

Tabelle 2a: Plazentaproben des Hundes, geordnet nach dem Trächtigkeitsstadium

Präparat	Trächtigkeitsstadium	Bezugsquelle
Hd Plac 736/00lila	Erstes Drittel	Veterinäranatomie
Hd Plac 2/05	10 d Gest (Gestation)	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 3/05	10 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 4/05	21 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 5/05	21 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 44/05	Erstes Drittel, recht früh	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 45/05	Erstes bis zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 48/05	Erstes Drittel, früh	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 49/05	Erstes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 50/05	Erstes (bis zweites) Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB15	Erstes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB22	Erstes Drittel, sehr früh	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB26	Erstes bis zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 745/00A	Zweites Drittel	Veterinäranatomie
Hd Plac 7/05	40 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 8/05	40 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 47/05	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 84/05	Zweites bis eher letztes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 85/05	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 86/05	Zweites bis letztes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 87/05	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 88/05	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 89/05	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 215/05 LB3	31 d Gest	KGGA, Giessen
Hd Plac 216/05 LB3	31 d Gest	KGGA, Giessen

Hd Plac 220/05 LB3	31 d Gest	KGGA, Giessen
Hd Plac 221/05 LB3	31 d Gest	KGGA, Giessen
Hd Plac 129/06 LB4	Erstes bis zweites Drittel	Tierärztliche Praxis, Koblenz
Hd Plac 131/06 LB4	Erstes bis zweites Drittel	Tierärztliche Praxis, Koblenz
Hd Plac LB9	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB18	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB27	Zweites bis letztes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB29	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac 9/05	45 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 10/05	45 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 11/05	50 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 12/05	50 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 13/05	50 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 14/05	55 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 15/05	55 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac 16/05	55 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Hd Plac LB12	Letztes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB24	In Geburt!!!	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac LB25	Letztes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Hd Plac Amy T58	58 d Gest	KGGA, Giessen
Hd Plac Kimba T60	60 d Gest	KGGA, Giessen
Hd Plac 1Senta T61	61 d Gest	KGGA, Giessen

Tabelle 2b: Plazentaproben der Katze, geordnet nach dem Trächtigkeitsstadium

Präparat	Trächtigkeitsstadium	Bezugsquelle
Ktz Plac 22/04	20 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Ktz Plac 23/04	20 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Ktz Plac 132/06 LB5	Erstes Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac 134/06 LB5	Erstes Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac 144/06 LB7	Erstes Drittel, früh	Tierärztliche Praxis, Koblenz
Ktz Plac 145/06 LB7	Erstes Drittel, früh	Tierärztliche Praxis, Koblenz
Ktz Plac LB13	Erstes Drittel?	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Ktz Plac LB19	Erstes Drittel, früh	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Ktz Plac LB20	Erstes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Ktz Plac 408/00A	Zweites Drittel	Veterinäranatomie
Ktz Plac 409/00A	Zweites Drittel	Veterinäranatomie
Ktz Plac 207/01A	Erstes bis zweites Drittel	Veterinäranatomie
Ktz Plac 24/04	30 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Ktz Plac 25/04	30 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Ktz Plac 26/04	40 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Ktz Plac 27/04	40 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Ktz Plac 59/05 LB1	3-4 Wo	KGGA, Giessen
Ktz Plac 60/05 LB1	3-4 Wo	KGGA, Giessen
Ktz Plac 73/05 LB1	3-4 Wo	KGGA, Giessen
Ktz Plac 74/05 LB1	3-4 Wo	KGGA, Giessen
Ktz Plac 194/05 LB2	Zweites Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac 195/05 LB2	Zweites Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac 206/05 LB2	Zweites Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac 207/05 LB2	Zweites Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac LB16	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Ktz Plac LB28	Zweites Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Ktz Plac 199/01A	Letztes Drittel	Veterinäranatomie
Ktz Plac 28/04	60 d Gest	Universität von São Paulo, Brasilien
Ktz Plac 152/06 LB8	Letztes Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac 153/06 LB8	Letztes Drittel	KGGA, Giessen
Ktz Plac LB10	Kurz vor Geburt	Clinica Veterinària S.M., Portugal

Ktz Plac LB14	Letztes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal
Ktz Plac LB17	Letztes Drittel	Clinica Veterinària S.M., Portugal

2.1.1 Entnahme und Präparation der Proben

Nach der Entnahme der Uteri im Rahmen von Kastrationen wurden diese schnellstmöglich präpariert. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Gewebeproben weitgehend steril entnommen und in steriler Alufolie in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder sie wurden in *RNAlater*® überführt. Anschließend wurden diese Proben bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Für die immunhistologischen Methoden wurden mit dem Skalpell Gewebeproben mit einer Größe von ca. 1 cm Länge x 1 cm Breite x 0,5 cm Tiefe aus mehreren Fruchtkammern herausgeschnitten. Diese Proben wurden 24 Stunden in Formalin fixiert und dann 3x im Abstand von ca. 10 Minuten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und 2-3 Tage lang mehrmals täglich in PBS gespült. Daraufhin wurden die Proben für 24 Stunden in 50%igen Ethanol und dann für mindestens 24 Stunden in 70%igen Ethanol überführt.

Nach dem Aufenthalt in 70%igem Ethanol wurden die Proben in 3 x 2 x 2 große Biopsiekörbchen verbracht und mit einem Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat (TP1050, Leica, Bensheim) entwässert und nach Xylol-Infiltration mit Paraffin durchtränkt. Die Entwässerung und Paraffinisierung des Gewebes geschieht nach folgendem Programm:

- 2 Stunden Ethanol 80 %
- 2 Stunden Ethanol 96 %
- 3 Stunden Ethanol 100 %
- 3 Stunden Ethanol 100 %
- 3 Stunden Ethanol 100 %
- 1 Stunde Xylol
- 45 Minuten Xylol
- 45 Minuten Xylol
- 40 Minuten Paraffin mit 59°C
- 40 Minuten Paraffin mit 59°C
- 40 Minuten Paraffin mit 59°C

Nach der Paraffinisierung wurden die Proben mit einer Ausbettstation (EG 1160, Leica) in 3 x 2 x 2 cm großen Stahlformen mit 60°C warmem Paraffin in Blöcke gegossen und zur Abkühlung und Härtung des Paraffins wurden die Formen auf die Kühlplatte des Gerätes gelegt.

2.2 Methoden

Im Anhang befinden sich die Ansätze für die verwendeten Lösungen und Puffer.

2.2.1 Immunhistochemische Untersuchungen

2.2.1.1 Vorbemerkungen

Von den in Paraffin eingebetteten Plazentaprobe n wurden 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und in einem 37°C warmen Wasserbad auf SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen) aufgezogen.

2.2.1.2 Verwendete Antikörper

Es wurden folgende Primär-Antikörper verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Primär-Antikörper

Antikörper/ Code	Klon	Isotyp	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-Human Smooth Muscle Actin M 0851	1A4	IgG2a, kappa Monoklonal	Maus	DakoCytomation	1:100
Cytokeratin Z0622	Wide Spectrum Screening	Polyklonal	Kaninchen (Rabbit Anti-Cow)	DakoCytomation	1:300 (Hd) 1:400 (Ktz)
Anti- Vimentin M 7020	3B4	IgG2a, kappa Monoklonal	Maus	DakoCytomation	1:100
VEGF (A- 20): sc-152	Polyklonal	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:300
Flt-1 (C-17): sc-316	Polyklonal	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:300 (Hd) 1:400 (Ktz)
Flk-1 (C-20): sc-315	Polyklonal	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:300

2.2.1.3 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC)-Methode

Diese Färbemethode basiert auf der hohen Affinität von Avidin für Biotin. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin begründet, dass Avidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Dadurch können sich bis zu vier Biotinmoleküle an ein Avidinmolekül anlagern, was das zu erzielende Signal verstärkt. Das zu bestimmende Antigen wird durch den jeweiligen Primärantikörper gebunden und mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, welcher die speziesspezifischen Antigene des Primärantikörpers detektiert, inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex zugegeben. Die freien Stellen des Avidins binden an das Biotin des Sekundärantikörpers und somit befindet sich die Peroxidase genau an der Stelle des gesuchten Antigens. Mit einem geeigneten Chromogen wird dann die Lokalisation der Peroxidase sichtbar gemacht. Die ABC-Methode wurde erstmals von Hsu et al. (1981) beschrieben.

2.2.1.4 Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

Man bezeichnet diese Methode auch als unmarkierte Antikörpermethode, erstmals wurde sie von Cordell et al. (1984) beschrieben. Diese immunhistochemische Färbemethode verwendet

einen bereits gebildeten löslichen Enzym/ Anti-Enzym-Immunkomplex. Um diesen löslichen Komplex zu erhalten, mischt man ein Enzym- die alkalische Phosphatase (AP)- und ein gegen das Enzym gerichtetes Antiserum („Antienzym“)- die anti-Alkalische Phosphatase. Um diesen Immunkomplex, in diesem Fall als APAAP-Komplex bezeichnet, zu erhalten, wird das Enzym im Überschuss zugegeben und sich eventuell bildende Präzipitate werden entfernt.

Der Name „unmarkierte Antikörpermethode“ beruht darauf, dass der Sekundärantikörper nicht konjugiert ist, sondern sich mit seinen beiden Fab-Fragmenten jeweils gegen die speziesspezifischen Antigene des Primärantikörpers und gegen die des Enzym-Immunkomplexes richtet. Somit fungiert er als ein Bindeglied zwischen dem Primärantikörper und dem Komplex. Aufgrund dessen spricht man auch von einem Brückenantikörper. Dementsprechend müssen der Primärantikörper und der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes aus derselben Spezies stammen, und der Sekundärantikörper muss gegen die Immunglobuline derjenigen Spezies gerichtet sein, aus der sowohl der Primärantikörper als auch der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes stammen. Meistens ist der Primärantikörper ein muriner monoklonaler Antikörper und der APAAP-Komplex ein muriner monoklonaler APAAP-Komplex. Um mit dieser Methode auch immunhistochemische Nachweise mit polyklonalen Primärantikörpern durchführen zu können, muss ein Zwischenschritt eingefügt werden. Vor dem Auftragen des eigentlichen Sekundärantikörpers, „mausifiziert“ man den Primärantikörper. Das bedeutet, dass sich ein muriner monoklonaler Antikörper, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet, an diesen bindet. Durch diesen Schritt werden dem Primärantikörper mausspezifische Antigene angehängt, so dass er im nächsten Schritt von dem Sekundärantikörper als ein muriner Antikörper erkannt wird.

2.2.1.5 ImmPRESS™ Detection System (Anti-Mouse Ig Peroxidase) von Linaris

Das ImmPRESS™ Detektionssystem basiert auf einer neuen Methode polymerisierender Enzyme und auf der Anhaftung dieser Polymere an Antikörper. Der Ansatz dieser Methode liegt darin, „Mikropolymere“ aus Enzymen zu formen, um Fehler zu vermeiden, welche bei der Verwendung großer Dextrane oder anderer Makromoleküle auftreten. Heftet man ein einzelnes „Mikropolymer“, welches eine hohe Dichte sehr aktiver Enzyme besitzt, an einen Sekundärantikörper, erhält man ein Reagenz, das einerseits die Fähigkeit besitzt, räumliche Beeinträchtigungen zu überwinden, andererseits besitzt es auch eine erhöhte Zugänglichkeit zur Zielstruktur. Als Resultat erreicht man eine besondere Sensitivität und Signalstärke. Ein

weiterer Vorteil des ImmPRESS™ Reagenz ist eine geringe Hintergrundfärbung. Die Elimination eines großen Trägermoleküls erlaubt eine bessere Diffusion des Reagenz zu den Zielstellen und eine Reduktion unspezifischer Bindungen. Das ImmPRESS™ Reagenz besteht aus hochreinen, auf Affinität gereinigten Sekundärantikörpern, welche mit einem einzelnen „Mikropolymer“ einer besonders aktiven Peroxidase gekoppelt sind.

2.2.1.6 Immunhistochemische Protokolle zum Nachweis von Aktin, Zytokeratin und Vimentin

Tabelle 4: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von Aktin (ABC-Methode)

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
1. Tag			
1. Entparaffinieren	Xylol Xylol	5 min 5 min	60°C Raumtemperatur (RT)
2. Entwässern	Abs. Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest.	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	
3. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
4. Blockieren	0,3 % H ₂ O ₂ in eiskaltem Methanol	30 min	Rüttler, RT
5. Spülen	PBS	2x 5 min	Rüttler
6. Permeabilisieren	Blockpuffer (PBS/BSA/TritonX)	5 min	
7. Proteinblock	5 % Pferdeserum in Blockpuffer	30 min	Feuchte Kammer
8. Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer (1:100)	Über Nacht	Bei 4°C
2. Tag			
9. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
10. Inkubieren	Sekundärantikörper (biotin. anti- Maus/anti-Kaninchen) Universal-AK 1:100	30 min	Feuchte Kammer, RT
11. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
12. Inkubieren	ABC-Elite-Kit (Vectastain)	40 min	Feuchte Kammer, RT
13. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
14. Detektieren	AEC-Lösung (Peroxidase Substratkit)	5-30 min Reaktion beobachten!	Feuchte Kammer, RT
15. Spülen	Aqua dest.	3x 5 min	Rüttler
16. Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec	Objektträger
17. Wässern	Fließendes Wasser	10 min	
18. Eindeckeln	Glyzeringelatine		

Tabelle 5: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von Zytokeratin und Vimentin (ABC-Methode)

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
1. Tag			
1. Entparaffinieren	Xylol Xylol	5 min 5 min	60°C Raumtemperatur (RT)
2. Entwässern	Abs. Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest.	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	Rüttler
4. Epitop freilegen	In Zitratpuffer kochen	20 min	95-100°C
5. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H ₂ O ₂ in eiskaltem Methanol	30 min	Rüttler, RT
7. Spülen	PBS	2x 5 min	Rüttler
8. Permeabilisieren	Blockpuffer (PBS/BSA/TritonX)	5 min	
9. Proteinblock	5 % Pferdeserum in Blockpuffer	30 min	Feuchte Kammer
10. Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer (Zytokeratin: Hd 1:300, Ktz 1:400; Vimentin 1:100)	Über Nacht	Bei 4°C
2. Tag			
11. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
12. Inkubieren	Sekundärantikörper (biotin. anti- Maus/anti-Kaninchen) Universal-AK 1:100	30 min	Feuchte Kammer, RT
13. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
14. Inkubieren	ABC-Elite-Kit (Vectastain)	40 min	Feuchte Kammer, RT
15. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
16. Detektieren	AEC-Lösung (Peroxidase Substratkit)	5-30 min Reaktion beobachten!	Feuchte Kammer, RT
17. Spülen	Aqua dest.	3x 5 min	Rüttler
18. Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec	Objektträger
19. Wässern	Fließendes Wasser	10 min	
20. Eindeckeln	Glyceringelatine		

2.2.1.7 Immunhistochemische Protokolle zum Nachweis von VEGF und dessen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2

Tabelle 6: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von VEGF (ABC-Methode)

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
1. Tag			
1. Entparaffinieren	Xylol Xylol	5 min 5 min	60°C Raumtemperatur (RT)
2. Entwässern	Abs. Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest.	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	Rüttler
4. Epitop freilegen	In Zitratpuffer kochen	20 min	95-100°C
5. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H ₂ O ₂ in eiskaltem Methanol	30 min	Rüttler, RT
7. Spülen	PBS	2x 5 min	Rüttler
8. Permeabilisieren	Blockpuffer (PBS/BSA/TritonX)	5 min	
9. Proteinblock	5 % Pferdeserum in Blockpuffer	30 min	Feuchte Kammer
10. Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer (1:300)	Über Nacht	Bei 4°C
2. Tag			
11. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
12. Inkubieren	Sekundärantikörper (biotin. anti-Maus/anti-Kaninchen) Universal-AK 1:100	30 min	Feuchte Kammer, RT
13. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
14. Inkubieren	ABC-Elite-Kit (Vectastain)	40 min	Feuchte Kammer, RT
15. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
16. Detektieren	AEC-Lösung (Peroxidase Substratkit)	5-30 min Reaktion beobachten!	Feuchte Kammer, RT
17. Spülen	Aqua dest.	3x 5 min	Rüttler
18. Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec	Objektträger
19. Wässern	Fließendes Wasser	10 min	
20. Eindeckeln	Glyceringelatine		

Tabelle 7: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von VEGF (APAAP-Methode)

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
1. Tag			
1. Entparaffinieren	Xylol Xylol	5 min 5 min	60°C Raumtemperatur (RT)
2. Entwässern	Abs. Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest.	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	
3. Spülen	TRIS-Puffer (s.Anhang)	5 min	Rüttler
4. Epitop freilegen	In Zitratpuffer kochen	20 min	95-100°C
5. Spülen	TRIS	3x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	20%ige Essigsäure	15-20 sec	4°C
7. Spülen	TRIS	2x 5 min	Rüttler
8. Proteinblock	Blockpuffer	30-60 min	Feuchte Kammer
9. Spülen	TRIS	3x 5 min	Rüttler
10. Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer (1:300)	Über Nacht	Bei 4°C
2. Tag			
11. Spülen	TRIS	3x 5 min	Rüttler
12. „Mausifizierung“	Mouse-anti-rabbit 1:50 in TRIS	45 min	Feuchte Kammer, RT
13. Spülen	TRIS	3x 5 min	Rüttler
14. Inkubieren	Rabbit-anti-mouse 1:50 in TRIS	45 min	Feuchte Kammer, RT
15. Spülen	TRIS	3x 5 min	Rüttler
16. Detektieren	APAAP-Komplex 1:50 in TRIS	45 min	Feuchte Kammer, RT
17. Spülen	TRIS	3x 5 min	Rüttler
18. Färben	Fuchsin-Lösung	1-30 min Reaktion beobachten!	
19. Spülen	Aqua dest.	3x 5 min	Rüttler
20. Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec	Objektträger
21. Wässern	Fließendes Wasser	10 min	
22. Eindeckeln	Glyceringelatine		

Tabelle 8: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von VEGF (ImmPRESS™ Detection System)

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
1. Tag			
1. Entparaffinieren	Xylol Xylol	5 min 5 min	60°C Raumtemperatur (RT)
2. Entwässern	Abs. Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest.	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	Rüttler
4. Epitop freilegen	In Zitratpuffer kochen	20 min	95-100°C
5. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H ₂ O ₂ in eiskaltem Methanol	30 min	Rüttler, RT
7. Spülen	PBS	2x 5 min	Rüttler
8. Permeabilisieren	Blockpuffer (PBS/BSA/TritonX)	5 min	
9. Proteinblock	5 % Pferdeserum in Blockpuffer	30 min	Feuchte Kammer
10. Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer (1:300)	Über Nacht	Bei 4°C
2. Tag			
11. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
12. „Mausifizierung“	Mouse-anti-rabbit 1:50 in PBS	45 min	Feuchte Kammer, RT
13. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
14. Inkubieren	ImmPRESS™ Detection System Anti-Mouse Ig Peroxidase	30 min	Feuchte Kammer, RT
15. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
16. Detektieren	AEC-Lösung (Peroxidase Substratkit)	5-30 min Reaktion beobachten!	Feuchte Kammer, RT
17. Spülen	Aqua dest.	3x 5 min	Rüttler
18. Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec	Objektträger
19. Wässern	Fließendes Wasser	10 min	
20. Eindeckeln	Glyceringelatine		

Dieses Protokoll für VEGF nach dem ImmPRESS™ Detection System hat sich letztendlich als das Beste erwiesen und wurde für die Auswertung herangezogen.

Tabelle 9: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von VEGFR-1 (ABC-Methode)

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
1. Tag			
1. Entparaffinieren	Xylol Xylol	5 min 5 min	60°C Raumtemperatur (RT)
2. Entwässern	Abs. Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest.	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	Rüttler
4. Epitop freilegen	In Zitratpuffer kochen	20 min	95-100°C
5. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H ₂ O ₂ in eiskaltem Methanol	30 min	Rüttler, RT
7. Spülen	PBS	2x 5 min	Rüttler
8. Permeabilisieren	Blockpuffer (PBS/BSA/TritonX)	5 min	
9. Proteinblock	5 % Pferdeserum in Blockpuffer	30 min	Feuchte Kammer
10. Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer (Hd 1:300, Ktz 1:400)	Über Nacht	Bei 4°C
2. TAG			
11. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
12. Inkubieren	Sekundärantikörper (biotin. anti- Maus/anti-Kaninchen) Universal-AK 1:100	30 min	Feuchte Kammer, RT
13. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
14. Inkubieren	ABC-Elite-Kit (Vectastain)	40 min	Feuchte Kammer, RT
15. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
16. Detektieren	AEC-Lösung (Peroxidase Substratkit)	5-30 min Reaktion beobachten!	Feuchte Kammer, RT
17. Spülen	Aqua dest.	3x 5 min	Rüttler
18. Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec	Objektträger
19. Wässern	Fließendes Wasser	10 min	
20. Eindeckeln	Glyceringelatine		

Tabelle 10: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von VEGFR-2 (ImmPRESS™ Detection System)

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
1. Tag			
1. Entparaffinieren	Xylol Xylol	5 min 5 min	60°C Raumtemperatur (RT)
2. Entwässern	Abs. Ethanol 96 % Ethanol 80 % Ethanol 70 % Ethanol Aqua dest.	5 min 5 min 5 min 5 min 5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	Rüttler
4. Epitop freilegen	Proteinase K (20 µg/ml)	15 min	37°C
5. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H ₂ O ₂ in eiskaltem Methanol	30 min	Rüttler, RT
7. Spülen	PBS	2x 5 min	Rüttler
8. Permeabilisieren	Blockpuffer (PBS/BSA/TritonX)	5 min	
9. Proteinblock	5 % Pferdeserum in Blockpuffer	30 min	Feuchte Kammer
10. Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer (1:300)	Über Nacht	Bei 4°C
2. TAG			
11. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
12. „Mausifizierung“	Mouse-anti-rabbit 1:50 in PBS	45 min	Feuchte Kammer, RT
13. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
14. Inkubieren	ImmPRESS™ Detection System Anti-Mouse Ig Peroxidase	30 min	Feuchte Kammer, RT
15. Spülen	PBS	3x 5 min	Rüttler
16. Detektieren	DAB-Lösung (Peroxidase Substratkit)	3-5 min Reaktion beobachten!	Feuchte Kammer, RT
17. Spülen	Aqua dest.	3x 5 min	Rüttler
18. Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec	Objektträger
19. Wässern	Fließendes Wasser	10 min	
20. Eindeckeln	Glyceringelatine		

2.2.1.8 Lichtmikroskopische Auswertung der Immunhistologie

Die Auswertung der Schnitte wurde am Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss AG, Oberkochen für Durchlicht- und Auflicht-Fluoreszenz durchgeführt. Die Bilder wurden mit dem Computerprogramm analysis® (Soft Imaging System GmbH, Münster) verwaltet und im Weiteren mit dem Grafikprogramm CorelDraw bearbeitet.

2.2.2 Gelelektrophorese und Western Blot mit NuPAGE® von Invitrogen

2.2.2.1 Allgemeine Grundlagen

Beim Western Blot werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung gelelektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend mittels Elektroblothing auf eine Membran transferiert und damit immobilisiert. Auf der Membran werden die Proteine dann einer Nachweisreaktion unterzogen, welche für ein oder mehrere Proteine der aufgetrennten Mischung spezifisch ist.

Die in dieser Arbeit angewandte Nachweisreaktion ist die indirekte Methode über die Alkalische Phosphatase. Dazu wurden die Western Breeze® Chromogenic Immunodetection System Kits von Invitrogen (Carlsbad, CA 92008 USA) verwendet.

Zur Darstellung von VEGF und den Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 mittels Western Blot wurden Plazentagewebeproben von Hund und Katze verwendet. Als Positivkontrollen dienten kommerziell erworbene Zelllysate der Firma Santa Cruz Biotechnology (siehe Tabelle 12).

2.2.2.2 Verwendete Antikörper und Positivkontrollen

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper im Western Blot

Antikörper	Klon	Isotyp	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
VEGF (A-20): sc-152	Polyklonal	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:100
Flt-1 (C-17): sc-316	Polyklonal	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:100
Flk-1 (S-20): sc-48161	Polyklonal	Polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	1:100

Tabelle 12: Verwendete Positivkontrollen im Western Blot

Produkt	Herkunft	Hersteller	Positivkontrolle für
NIH/3T3 Whole Cell Lysate: sc-2210	Maus	Santa Cruz Biotechnology	VEGF (A-20): sc-152
A-10 Cell Lysate: sc-3806	Ratte	Santa Cruz Biotechnology	Flt-1 (C-17): sc-316
Mouse liver extract: sc-2256	Maus	Santa Cruz Biotechnology	Flk-1 (S-20): sc-48161

2.2.2.3 Vorbemerkungen

Die Auswahl des verwendeten Gels ist abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins, welches detektiert werden soll.

Hier wurden für den VEGF-Antikörper 12%ige Bis-Tris Gele (NuPAGE™, Invitrogen, Carlsbad, CA 92008 USA) verwendet, für die beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 wurden 3-8%ige Tris-Azetat Gele (NuPAGE™, Invitrogen) verwendet. Des weiteren wurde je nach Proteingröße auch ein anderes Puffersystem ausgewählt. So wurde für VEGF ein MOPS-Puffer eingesetzt (NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x), Invitrogen), während für den Rezeptor VEGFR-2 ein Tris-Azetat-Puffer (NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x), Invitrogen) verwendet wurde. Für den Rezeptor VEGFR-1 wurde ein Tris-Glyzin-Puffer (SDS-Page Puffer) eingesetzt.

2.2.2.4 Protokoll für Protein-Extraktion aus Kryomaterial (TRIzol® Reagenz)

Homogenisierung des Gewebes:

- Gefrorenes Gewebe in einer Porzellanschale mit flüssigem Stickstoff mörsern
- Circa 100 mg des Gewebes in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und 1 ml TRIzol® Reagenz (Life Technologies, Karlsruhe) zugeben
- Homogenisierung des Gewebes mit dem Ultra-Turrax, diesen auf höchste Geschwindigkeitsstufe einstellen
- 5 min bei RT stehen lassen

Phasentrennung:

- 200 µl Trichlormethan (Chloroform) pro ml eingesetztem TRIzol® zugeben
- Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Parafilm verschließen und vorsichtig umschwenken
- 5 min bei RT stehen lassen
- 15 min bei 4°C und 14000 UpM zentrifugieren
- Ergebnis: es sind drei Phasen erkennbar: die obere wässrige Phase ist farblos (RNA), die mittlere Phase ist weiß (Proteine) und die untere organische Phase ist rot (DNA)

Protein-Präzipitation:

- Interphase und untere Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- 300 µl 100%igen Ethanol (-20°C) zupipettieren
- Proben vortexen
- Proben 5 min bei RT stehen lassen, anschließend vortexen
- Proben 10 min bei 4°C und 12000 UpM zentrifugieren
- Ergebnis: DNA im Pellet, Proteine im Überstand
- Überstand (ca. 800 µl) in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Zum Überstand 1,5 ml Isopropanol zupipettieren
- Proben vortexen
- Proben 5 min bei RT stehen lassen, anschließend vortexen
- Proben 10 min bei 4°C und 12000 UpM zentrifugieren

Waschen der Proteine:

- Überstand verwerfen
- Pellet mit 96%igem Ethanol (+ 0,3 M Guanidinhydrochlorid) lösen
- Proben vortexen
- Proben 30 min bei RT stehen lassen, anschließend vortexen
- Proben 10 min bei 4°C und 12000 UpM zentrifugieren
- Diesen Waschschrift 2x wiederholen
- Überstand verwerfen
- Pellet in 2 ml 70%igem Ethanol lösen
- Proben vortexen
- Proben 20 min bei RT stehen lassen, anschließend vortexen
- Proben 10 min bei 4°C und 12000 UpM zentrifugieren

Resuspendieren:

- Überstand verwerfen
- Pellet bei 37°C im Trockenschrank trocknen
- Pellet in 1%iger SDS-Lösung bei 70°C im Wasserbad resuspendieren
- Proben 10 min bei 4°C und 12000 UpM zentrifugieren
- Pellet verwerfen, Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
- Lagerung der Proben bei -20°C

Proteinmessung am Photometer

Standardmessung:

- Gerät einschalten; Programm BCA wählen
- 100 µl BCA Protein Assay Reagent A und 2 µl BCA Protein Assay Reagent B mischen → grünliche Farbe
- 95 µl dieses Gemisches und 5 µl BSA-Standard (2 mg/ml) mischen und 30 min bei 37°C in den Trockenschrank stellen
- Dann innerhalb von 10 min messen
- Küvette mit 100 µl Aqua dest. füllen
- Taste „Blank“ drücken → Nullwert
- Küvette entleeren und mit 100 µl Standardgemisch füllen

- Taste „Sample“ drücken → BSA-Standard-Wert wird angezeigt

Probenmessung:

- 100 µl BCA Protein Assay Reagent A und 2 µl BCA Protein Assay Reagent B mischen → grünliche Farbe
- 95 µl dieses Gemisches und 5 µl Probe mischen, vortexen und 30 min bei 37°C in den Trockenschrank stellen
- Dann innerhalb von 10 min messen
- Probe in Küvette füllen und Taste „Sample“ drücken
- Falls die Proteinkonzentration zu hoch ist, sich also außerhalb der Kalibrierung befindet, mischt man 2,5 µl Probe mit 2,5 µl 1%iger SDS-Lösung und mischt dann diese 5 µl verdünnte Probe mit 95 µl BCA-Gemisch A/B

2.2.2.5 Protokoll für Protein-Extraktion aus Kryomaterial mit Boehringer Lyse Puffer (BLP)

Da es sich bei den beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 um membranständige Rezeptoren handelt, wurde der Boehringer Lyse Puffer eingesetzt, um diese besser zu lösen:

- Gefrorenes Gewebe in ein Eppendorf-Tube überführen
- Zugabe von 200 µl Boehringer Lyse Puffer
- Zerkleinern des Gewebes mit einem Douncer
- Erneute Zugabe von 200 µl Boehringer Lyse Puffer
- 10 min Inkubation auf Eis
- Zentrifugation bei 14000 UpM um die Gewebereste zu entfernen
- Überstand (Lysat) in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen, Pellet verwerfen
- Bis zur weiteren Verwendung Lagerung der Proben bei -20°C

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC-Protein Assay Kit der Firma BioRad (München) verwendet.

In eine 96Well Mikrotiterplatte wurden als Standard 0, 2, 3, 4 und 5 µl einer BSA-Lösung (2 mg/ml) und je 2 µl der Proteinlysate gegeben. Weiterhin wurden zu jeder Probe 20 µl A' (1000 µl Lösung A + 25 µl Lösung S) und 200 µl Lösung B pipettiert. Nach einer Inkubation

von 5 Minuten bei RT wurden die Proben bei 620 nm im ELISA-Reader (Dynatech MR 5000) ausgelesen. Mit Hilfe der Standardwerte konnte so die jeweilige Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.2.2.6 Protokoll Gelelektrophorese und Western Blot mit NuPAGE® und WesternBreeze® Chromogenic Immunodetection System

Vorbereitungen:

- Zunächst sollte eine Auswahl der Proteine, des Gels und des Puffers getroffen werden. Dabei sollte die Konzentration der Proteinproben für alle Proben ungefähr gleich sein. Je nach dem Anteil des gewünschten Proteins am Gesamtproteingehalt kann man mehr oder weniger Protein/Probe schätzen
- Vorheizen des Wasserbads auf 95°C
- Auftauen der Proteinproben und der kommerziell erworbenen Positivkontrollen auf Eis
- Berechnung der Probenansätze
- Ansetzen des MOPS- oder Tris-Azetat-Puffers: 50 ml Running Buffer(20x) plus 950 ml Aqua dest.
- Mastermix aus Sample Buffer (NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x), Invitrogen) und Reducing Agent (NuPage® Sample Reducing Agent (10x), Invitrogen) für alle Proben herstellen und zu den einzelnen Proteinproben hinzugeben. Das Ansetzen der Proben erfolgt auf Eis
- Fertige Proben kurz anzentrifugieren
- Proben für circa 10 min in 95°C Wasserbad, anschließend Proben wieder auf Eis
- 500 µl Antioxidant (NuPAGE®, Invitrogen) auf 200 ml Running Buffer pipettieren

Gelelektrophorese:

- Während die Proben im Wasserbad sind: Gelkassetten vorbereiten: Abspülen mit Aqua dest., Klebestreifen abziehen, Kamm entfernen, Slots mit Running Buffer + Antioxidant 3x kurz durchspülen und dann in die Kammer Novex Mini-Cell (Xcell SureLock™ Electrophoresis Cell, Invitrogen) einspannen
- Befüllen der inneren Kammer mit MOPS- oder Tris-Azetat-Puffer mit Antioxidant

- Äußere Kammer mit circa 600 ml MOPS- oder oder Tris-Azetat Puffer ohne Antioxidant füllen
- Vor dem Pipettieren die Proben wieder auf Eis stellen
- Befüllen der Slots mit Hilfe von ausgedünnten Pipettenspitzen (ART® GEL Pipet Tips, Molecular BioProducts, greiner bio-one, Frickenhausen)
- Als Kontrolle beziehungsweise zum Vergleich des Molekulargewichts wird eine Standardproteinmischung (Proteinmarker: See Blue® Plus 2 Prestained Standard (1x), Invitrogen) eingesetzt
- Verschließen der Kammer mit Deckel und an den Powerpack (Biometra® Standard Power Pack P25) anschließen
- Für den VEGF-Antikörper lief das 12%ige Bis-Tris Gel mit dem MOPS-Puffer 60 Minuten bei einer Spannung von 200 Volt
- Für die beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 lief das 3-8%ige Tris-Azetat Gel mit dem Tris-Azetat-Puffer 90 Minuten bei einer Spannung von 150 Volt
- Während der Gelelektrophorese erfolgen die Vorbereitungen für den Western Blot

Western Blot:

- Ansetzen des Transferpuffers
- Schaumstoffkissen, Membranen und Filterpapier in Transferpuffer einweichen. Bei den Schaumstoffkissen ist darauf zu achten, dass sie gut eingeweicht sind und keine Luftblasen enthalten
- Nach Abschluss der Elektrophorese wird der Strom abgestellt und der Puffer vorsichtig abgegossen
- Entnahme der Gelkassetten und Aufbrechen der Gelkassetten mittels eines Schabers
- Nach dem Öffnen der Gelkassette werden die Slots und der untere Rand des Gels ausgestanzt und entfernt
- Ein eingeweichtes Filterpapier wird auf das Gel gelegt, dann wird das Gel mit Hilfe des Schabers vorsichtig von der Kassettenplatte gelöst
- Aufbau des Blotting-Sandwich im Xcell II™ Blot Module (Invitrogen) von der Kathode Richtung Anode aus gesehen:

Für 1 Gel:

- 2 Schaumstoffkissen (Sponge Pad for Xcell II™ Blotting, Invitrogen)
- Filterpapier (Filter Paper Sandwich, 0,2 µm Pore Size, Invitrogen)

- Nitrocellulose-Membran (Invitrogen)
- Gel
- Filterpapier
- 3 Schaumstoffkissen

Für 2 Gele:

- 2 Schaumstoffkissen
 - Filterpapier
 - Membran I
 - Gel I
 - Filterpapier
 - 1 Schaumstoffkissen
 - Filterpapier
 - Membran II
 - Gel II
 - Filterpapier
 - 2 Schaumstoffkissen
- Mittels einer Glaspipette werden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt
 - Zusammenbau der Blot-Apparatur, dabei immer darauf achten, dass alles eingeweicht ist. Nachdem alles in die Kassette eingelegt ist, wird sie in die Kammer eingespannt.
 - Innere Kammer bis knapp unter den Rand mit Transferpuffer füllen
 - Äußere Kammer mit circa 650 ml Aqua bidest. füllen und anschließend mit dem Deckel verschließen
 - Anschließen an den Powerpack; alle drei Antikörper, VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2, wurden bei einer Spannung von 30 Volt für zwei Stunden geblottet

Gelfärbung und Proteindetektion:

- Nach Beenden der Laufzeit wird das Gel für 30 min in Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) auf dem Wipptisch (Heidolph®, Polymax 1040, MAGV-Laborbedarf, Rabenau-Londorf) inkubiert
- Nach 30 min wird das Brilliant Blue G abgegossen und die Gele werden mit Coomassie Destain entfärbt. Das Coomassie Destain sollte mindestens einmal

gewechselt werden und die Inkubation sollte so lange erfolgen, bis sich die Gele soweit entfärbt haben, dass nur noch die Proteinbanden zu erkennen sind

- Die Membranen werden nach Beenden der Laufzeit zur Überprüfung der Blot-Effizienz für circa 1 min in 0,2%ige Ponceau S- Lösung gegeben
- Membranen 2x 3 min in Aqua bidest. spülen
- Zur Proteindetektion wurden die WesternBreeze® Chromogenic Immunodetection Systeme (Invitrogen) verwendet. Für den VEGF- und Flt-1-Antikörper wurde das Western Breeze® Chromogenic Immunodetection System zur Detektion von Kaninchen-Primärantikörpern verwendet, für den Flk-1-Antikörper das zur Detektion von Ziegen-Primärantikörpern:
- Vorbereiten der Blocking solution: 20 ml-Ansatz: 14 ml Aqua bidest. + 4 ml Blocker/Diluent A + 2 ml Blocker/Diluent B
- Membranen 30 min in Blocking solution blocken
- Spülen der Membranen in Aqua bidest. für 2x 3 min
- Inkubation der Membranen in Primärantikörper in Blocking solution über Nacht bei 4°C
- Ansetzen der Antibody Wash solution: 150 ml Aqua bidest. + 10 ml Antibody Wash solution (16x)
- Membranen 3x 5 min in Antibody Wash spülen
- Inkubation der Membranen in 2°Antibody solution für 60 min
- Membranen 3x 5 min in Antibody Wash spülen
- Membranen 2x 2 min in Aqua bidest. spülen
- Auslösen der Färbereaktion: Membranen 1-60 min mit Chromogen (BCIP/NBT) inkubieren
- Membranen 2x 2 min in Aqua bidest. spülen
- Membranen auf Filterpapier im Trockenschrank (37°C) über Nacht trocknen

2.2.2.7 Dokumentation

Die Dokumentation der Membranen erfolgte mit Hilfe eines Scanners (HP Scanjet G4050), die Gele wurden zur Dokumentation mit Hilfe des Folienschweißgerätes vacufix electronic (electric petra) in Folie eingeschweißt.

2.2.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.2.3.1 Allgemeine Grundlagen

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und ermöglicht *in vitro* von bestimmten Abschnitten eines DNA-Moleküls enzymatisch sehr viele Kopien herzustellen. Zur Amplifizierung von RNA-Sequenzen wird die Reverse-Transkriptase-PCR angewendet. Hierbei wird zunächst die RNA mit Hilfe des Enzyms RNA-abhängige DNA-Polymerase in einen komplementären DNA-Einzelstrang (cDNA) umgeschrieben (reverse Transkription). In einer anschließenden PCR kann man durch den Einsatz von spezifischen Primern die gesuchte cDNA vervielfältigen. Die PCR besteht aus folgenden Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Bindung der Primer an die DNA (Hybridisierung), Verlängerung der Primer (Amplifikation).

Grundsätzlich kann man bei der Durchführung einer RT-PCR zwischen einer One-Step-RT-PCR und einer Two-Step-RT-PCR unterscheiden. Bei einer One-Step-RT-PCR erfolgen die reverse Transkription und die PCR in einem Reaktionsgefäß. Bei einer Two-Step-RT-PCR hingegen wird zuerst eine Erststrang-Synthese durchgeführt, bei welcher die RNA als Matrize für die cDNA dient. In einem weiteren Schritt wird dann diese cDNA als Matrize in der PCR verwendet (Schrumpf 2002). Bei der hier durchgeführten RT-PCR handelt es sich um eine Two-Step-RT-PCR.

2.2.3.2 Extraktion der Gesamt-RNA aus Gefriermaterial

Zum Schutz der RNA vor einem Abbau durch RNasen aus der Umgebung und aus dem Gewebe selber sowie zum Schutz vor Kontaminationen der Proben sind vor der Extraktion folgende Vorbereitungen zu treffen:

- RNase-freien Arbeitsplatz sicherstellen: Arbeitsplatz mit absolutem Ethanol und RNase-AWAY® Reagent säubern
- RNase-freie Materialien sicherstellen: Glas, Porzellan, Metall und Arbeitsgeräte in Aluminiumfolie verpacken und für 4 Stunden bei 180°C sterilisieren
- DEPC (Diethylpyrocarbonat) zur Herstellung RNase-freier Lösungen verwenden
- Lösungen, Eppendorf-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen bei 120°C autoklavieren
- Tragen von Einmal-Handschuhen zur Verhinderung der Kontamination der Proben durch RNasen der Haut
- Gewebe ständig in flüssigem Stickstoff aufbewahren

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Reagenz TRIzol® aus tiefgefrorenen Plazentaprobe von Hunden und Katzen isoliert. TRIzol® ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, und die Isolation mit TRIzol® ist eine Weiterentwicklung der *single step* RNA-Isolationsmethode von Chomczynski und Sacchi (1987). Während der Homogenisierung erhält das starke Denaturierungsmittel die Integrität der RNA. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation wird das Homogenisat in drei Phasen aufgetrennt: eine obere, wässrige Phase, eine mittlere weiße und eine untere organische Phase. Die obere Phase enthält die RNA, die Interphase enthält die DNA und in der unteren organischen Phase befindet sich das Protein.

2.2.3.3 Protokoll für RNA-Extraktion aus Kryomaterial (TRIzol® Reagenz)

Homogenisierung des Gewebes:

- Gefrorenes Gewebe in einer Porzellanschale mit flüssigem Stickstoff mörsern
- Circa 100 mg des Gewebes in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen und 1 ml TRIzol® Reagent zugeben
- Homogenisierung des Gewebes mit dem Ultra-Turrax, diesen auf höchste Geschwindigkeitsstufe einstellen
- 5 min bei RT stehen lassen

Phasentrennung:

- 200 µl Trichlormethan (Chloroform) pro ml eingesetztem TRIzol® zugeben
- Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Parafilm verschließen und vorsichtig umschwenken
- 5 min bei RT stehen lassen
- 15 min bei 4°C und 14000 UpM zentrifugieren
- Ergebnis: es sind drei Phasen erkennbar: die obere wässrige Phase ist farblos (RNA), die mittlere Phase ist weiß (Proteine) und die untere organische Phase ist rot (DNA)

RNA-Präzipitation:

- Obere wässrige Phase ohne Verunreinigung durch Interphase abpipettieren und in ein neues Schraubdeckel-Tube überführen
- Gleiche Menge Isopropanol (-20°C) zupipettieren
- Proben vortexen
- Proben 30 min bei -20°C stehen lassen, anschließend vortexen
- Proben 10 min bei 4°C und 14000 UpM zentrifugieren

- Das Präzipitat soll gelartig sein und an der unteren Seite des Röhrchens liegen

Waschen der RNA:

- Isopropanolüberstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol in DEPC-Wasser (-20°C) durch vorsichtiges Kippen lösen
- Proben für 10 min in Eiswasser stellen
- Proben vorsichtig schwenken und 10 min bei 4°C und 14000 UpM zentrifugieren
- Waschschrift 1x wiederholen

Resuspendieren:

- Überstand verwerfen
- RNA-Pellet bei 37°C im Trockenschrank trocknen
- RNA-Pellet in 50 µl DEPC-Wasser resuspendieren (70°C Wasserbad)
- Lagerung der Proben in Flüssigstickstoff

2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte mittels Absorptions-Einzelstrahlphotometrie (Spektralphotometrie) an einem BioPhotometer (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg); die RNA-Konzentration wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Dazu wird die RNA mit einer 0,1 M Tris-HCL-Lösung soweit verdünnt, bis die Konzentration der RNA mit dem Photometer messbar ist. Der gemessene Wert (in µg/ml) dient dazu, das einzusetzende Volumen der wässrigen RNA-Lösung für die Erststrang-Synthese zu bestimmen, da vor der DNase-Behandlung eine Standard-Verdünnung von 200 ng/µl hergestellt wird.

Für die Messung wurden Kunststoff-Einmalküvetten (UVette® 220-1600nm, MAGV GmbH, Rabenau-Londorf) verwendet. Vor jeder Messung wurde ein Leerwert ermittelt.

- Küvette mit 69 µl Tris-Puffer (0,1 M Tris-HCl in DEPC-behandeltem Wasser, pH 7,3) zur Leerwertbestimmung verwenden
- 1 µl RNA-Lösung dazugeben, gut mischen und Probe messen
- Ergebnis wird in µg/ml angezeigt

2.2.3.5 cDNA-Erststrang-Synthese (reverse Transkription)

Bevor eine Probe als Matrice in einer PCR dienen kann, muss aus der isolierten RNA eine cDNA- Erststrang-Synthese (reverse Transkription) erfolgen.

Ein DNase-I Verdau wird als Nachweis durchgeführt, dass die extrahierte Gesamt-RNA keine Verunreinigungen mit genomischer DNA enthält.

DNase I-Behandlung:

- Alle Pipettierschritte für die DNase-Behandlung erfolgten unter Kühlung auf Eis
- Vor der DNase-Behandlung erfolgt eine Verdünnung der RNA auf 200 ng/μl
- Pro Eppendorf-Tube werden 3,25 μl DNase-Mix und 6,65 μl RNA-Lösung (200 ng/μl) pipettiert, um einen Ansatz von 9,90 μl Gesamtvolumen zu erhalten

Tabelle 13: Zusammensetzung des DNase-Mixes für die DNase-Behandlung

Komponenten	Einfacher Ansatz (μl)	Stammlösung
MnCL ₂	1 μl	10 nM
PCR-Puffer	1 μl	10x
DNase I, RNase frei	1 μl	10 U/μl
RNase-Inhibitor	0,25 μl	40 U/μl
Gesamtvolumen	3,25 μl	

Die DNase-Behandlung wurde in einem T3 Thermocycler (Whatman Biometra GmbH i.L., Göttingen) bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Phase a) 10 min bei 37°C

Phase b) 5 min bei 75°C

Phase c) abkühlen auf 4°C

Da die Stabilität der RNA nach der DNase-Behandlung nur für sehr kurze Zeit gewährleistet ist, wurde die Reverse Transkription (RT) direkt im Anschluss daran durchgeführt.

Reverse Transkription (RT):

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des Gold RNA PCR Core Kits (Perkin Elmer Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

Pro Ansatz wurde den 8,5 μl des RT-Mastermixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 14) 1,5 μl DNase-behandelte RNA-Lösung zugegeben.

Tabelle 14: Zusammensetzung des RT-Mastermixes für die RT

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
MgCl ₂	2 µl	25 mM
PCR-Puffer	1 µl	10x
dNTP-Mix ¹⁾	4 µl	10 mM
Random Hexamere	0,5 µl	50 µM
RNase-Inhibitor	0,5 µl	20 U/µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl	50 U/µl
Gesamtvolumen	8,5 µl	

¹⁾ Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix

Auch die Reverse Transkription wurde in dem T3 Thermocycler (Whatman Biometra GmbH i.L., Göttingen) nach folgendem Programm durchgeführt.

8 min	bei	21°C
15 min	bei	42°C
5 min	bei	99°C
5 min	bei	5°C

Nach einer weiteren Temperaturabsenkung auf 4°C können die Proben so bis zu ihrer Entnahme im Thermocycler bei 4°C aufbewahrt werden.

Die während der RT synthetisierte cDNA ist stabil und kann bei -20°C bis zu weiteren Untersuchungen gelagert werden.

2.2.3.6 Verwendete Primer

Die canine und feline cDNA wurde auf das Vorhandensein der mRNA von VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 untersucht. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert. Die ausgewählten Primersequenzen der bekannten Gensequenzen des Hundes mit der jeweiligen Accession Nummern der Gendatenbank (NCBI Acc.-Nr.) sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Primersequenzen, Amplifikatgröße und NCBI Accession Nummern

Primer	Primersequenzen (5'→3')	Amplifikat- größe	NCBI Acc.-Nr.
VEGF 164 dog forward primer	GTG CCC ACT GAG GAG TTC AAC	72 bp	AF133248
VEGF 164 dog reverse primer	CCC TAT GTG CTG GCC TTG AT	72 bp	AF133248
VEGFR-1 dog forward primer	TGC CTG AAA CAG TGA GAA AGG A	81 bp	AF262963
VEGFR-1 dog reverse primer	TGC AGA ACT GTT TGC CAT TCC	81 bp	AF262963
VEGFR-2 dog forward primer	TGA CAT GGG CTC GGT CAT T	75 bp	NM_001048024
VEGFR-2 dog reverse primer	TGT TGG TCG CTA ACA GAA GCA	75 bp	NM_001048024

2.2.3.7 Protokolle der PCR für VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2

Es wurde für alle drei Primerpaare, also für VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 das selbe Programm verwendet. Die PCR wurde im T3 Thermocycler (Whatman Biometra GmbH i.L., Göttingen) durchgeführt. Es wurde auch eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der anstatt der cDNA DEPC-Wasser eingesetzt wurde.

Verwendet wurde das Go Taq® Flexi DNA-Polymerase Kit von Promega GmbH, Mannheim sowie der dNTP-Mix 10 mM von Promega GmbH.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die PCR

Komponenten	PCR-Reaktionsansatz
DEPC-behandeltes Wasser	13,35 µl
5x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
cDNA	1 µl
Go Taq® Flexi DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Deckelheizung	99°C		
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	1 min	45 Wiederholungen
Annealing	60°C	1 min	
Extension	60°C	5 min	
Abkühlung	4°C	∞	

Zur Kontrolle und zur Beurteilung der Qualität der extrahierten RNA wurde jede Probe mittels eines „Housekeeping Genes“, hier β -Aktin, überprüft.

Die Sequenz der Primer lautet wie folgt:

Tabelle 17: Primersequenzen und Amplifikatgröße von β -Aktin

Primer	Primersequenzen (5'→3')	Amplifikatgröße
β -Aktin forward primer	CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G	202 bp
β -Aktin reverse primer	GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC	202 bp

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die PCR für β -Aktin

Komponenten	PCR-Reaktionsansatz
DEPC-behandeltes Wasser	15,9 μ l
10x PCR-Puffer	3 μ l
Q-Solution	6 μ l
dNTP (10 mM)	0,6 μ l
Forward Primer (10 pmol/ μ l)	0,6 μ l
Reverse Primer (10 pmol/ μ l)	0,6 μ l
cDNA	3 μ l
Taq® DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,3 μ l

Verwendet wurde das Taq® DNA-Polymerase Kit von Qiagen GmbH, Hilden sowie der dNTP-Mix 10mM von Promega GmbH, Mannheim.

Die PCR für β -Aktin wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Deckelheizung	104°C	
Initiale Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	94°C	1 min
Annealing	55°C	1 min
Extension	72°C	1 min

Finale Extension	72°C	10 min
Abkühlung	4°C	∞

2.2.3.8 Gelelektrophorese- Detektion und Dokumentation

Die DNA-Amplifikate wurden über die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert. Dazu wurden die Proben in einer horizontalen Gel-Elektrophoresekammer auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Ein 50 bp DNA-Marker diente zur Bestimmung der Amplifikatgrößen.

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden 0,75 g Agarose mit 30 ml 1x TAE-Puffer (siehe Anhang) versetzt und in einer Mikrowelle bei 800 Watt zum Lösen aufgeköcht. Die Lösung wurde dann bei Raumtemperatur (RT) auf circa 70°C abgekühlt und daraufhin luftblasenfrei in einen Elektrophorese-Schlitten gegossen. Hierbei formt ein eingesetzter Kamm die Taschen (Slots), in welche die PCR-Produkte geladen werden können. Nach Erstarren des Gels bei RT wurden der Kamm und die Gummi-Endblöcke vorsichtig entfernt und das Geltablett in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Laufpuffer wurde ein 1x TAE-Puffer verwendet, mit dem die Elektrophoresekammer befüllt wurde, bis das Gel circa 0,5 cm mit Puffer überschichtet ist. Die Slots wurden mit 12 µl PCR-Produkt befüllt beziehungsweise mit 12 µl Markeransatz, der sich wie folgt zusammensetzt: 4 µl loading buffer, 6 µl steriles Aqua bidest. und 2 µl 1:1 mit sterilem Aqua bidest. verdünnter 50 bp Marker. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 Volt 50 Minuten lang durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 Minuten lang in einem SYBR® Green I-Bad nachgefärbt, zur Interkalierung in die DNA. Nach dem Färbebad wurden die DNA-Amplifikate unter UV-Licht mit einem Transilluminator (High Performance Ultraviolett Transilluminator; Ultra Violett Products, Cambridge, UK) detektiert und mittels einer Polaroid GelCam unter Verwendung von Polaroid-Sofortbildfilmen (unbeschichtete Schwarz/weiß-Filme, Typ 667) dokumentiert.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anschließend durch Sequenzierung in einem kommerziellen Labor (QIAGEN Genomic Services; QIAGEN GmbH, Hilden) bestätigt.

2.2.4 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR

Die Real Time-PCR, auch “quantitative PCR” genannt, stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar. Das Ziel der quantitativen PCR ist es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge an eingesetztem DNA- beziehungsweise RNA-Template zu schließen (Schrimpf 2002). Bei der Real Time-PCR werden Themocycler verwendet, in denen die PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung erfasst werden können. Dazu verwendet man entweder sequenzspezifische Sondenmoleküle, die mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter und einem Quencher-Molekül markiert sind.

Während des Annealing-Schrittes binden neben den sequenzspezifischen PCR-Primern auch die sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden (hier TaqMan®-Sonden) an die denaturierte Zielsequenz. Analog zu der konventionellen RT-PCR wurde die mRNA vor der eigentlichen PCR in ein geeignetes Template (cDNA) mittels Reverser Transkriptase umgeschrieben. Die DNase-Behandlung und die Reverse Transkription erfolgten nach den in Kapitel 2.2.3.5. beschriebenen Protokollen.

2.2.4.1 Allgemeine Grundlagen

TaqMan PCR-Prinzip:

Zusätzlich zu dem für die Amplifikation benötigten Primerpaar wird der Reaktion ein kurzes Oligonukleotid zugesetzt, welches als Gensonde spezifisch an die PCR-Matrize bindet. Dieses als TaqMan-Sonde bezeichnete Oligonukleotid ist am 5′ Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff „6-FAM“ markiert, am 3′ Ende befindet sich eine Fluoreszenz löschende Verbindung (Quencher), TAMRA. Zunächst erhält man bei der Verwendung von TaqMan-Sonden kein Fluoreszenzsignal, da die Fluoreszenzemission des Reporters von dem Quencher unterdrückt wird. Die Taq-DNA-Polymerase verlängert - ausgehend von spezifisch gebundenen Primern - die komplementäre Sequenz und erreicht während der Synthese des Zweitstranges die ebenfalls spezifisch gebundene Sonde. Durch die 5′-3′-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Fluoreszenzsonde hydrolytisch gespalten. Quencher und Fluoreszenzfarbstoff sind somit getrennt, was zur Emission eines Fluoreszenzsignals definierter Wellenlänge führt, welches messtechnisch erfasst werden kann. Diese während der Synthese gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Stränge und damit proportional zur Menge an Ausgangs-DNA (Schrimpf 2002). Da die Taq-Polymerase ihre 5′-3′-Exonucleaseaktivität nur am DNA-Doppelstrang

entfalten kann, werden die nicht hybridisierten Sondenmoleküle nicht abgebaut und es zeigt sich kein Fluoreszenzsignal.

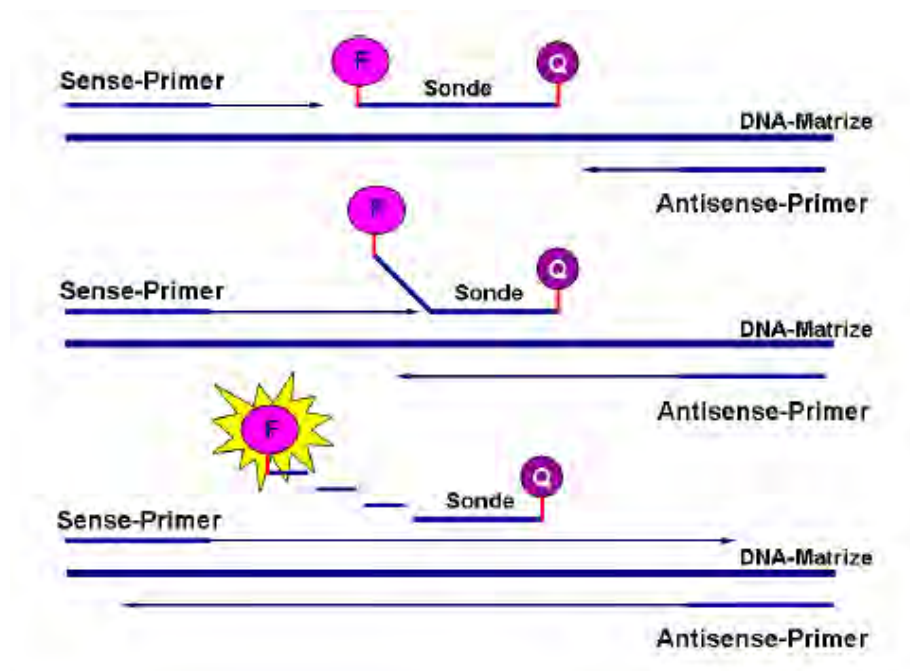


Abbildung 3: TaqMan-Prinzip: Erst getrennt vom Quencher-Molekül (Q) wird die Reporter-Fluoreszenz (F) messbar und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an (Eurogentec, Seraing, Belgien).

2.2.4.2 Verwendete Primer und Sonden

Tabelle 19 stellt die Basensequenzen der verwendeten Primer und TaqMan-Sonden dar. Sie wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA) ausgewählt. Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg hergestellt. Die TaqMan-Sonden wurden von dem Hersteller des TaqMan® qPCR MasterMixes (Eurogentec, Seraing, Belgien) synthetisiert und für die hier durchgeführte Real Time PCR von Herrn M. Kowalewski, AG Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Giessen, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 19: Die in der Real Time PCR verwendeten Primer und TaqMan-Sonden Sequenzen

Primer	Primersequenzen (5'→3')	Amplifikat- größe	NCBI Acc.-Nr.
GAPDH forward primer	GCT GCC AAA TAT GAC GAC ATC A	75 bp	AB028142
GAPDH reverse primer	GTA GCC CAG GAT GCC TTT GAG	75 bp	AB028142
GAPDH- TaqMan Sonde	TCC CTC CGA TGC CTG CTT CAC TAC CTT		AB028142
VEGF 164 dog forward primer	GTG CCC ACT GAG GAG TTC AAC	72 bp	AF133248
VEGF 164 dog reverse primer	CCC TAT GTG CTG GCC TTG AT	72 bp	AF133248
VEGF 164 dog- TaqMan Sonde	CAC CAT GCA GAT TAT GCG GAT CAA ACC		AF133248
VEGFR-1 dog forward primer	TGC CTG AAA CAG TGA GAA AGG A	81 bp	AF262963
VEGFR-1 dog reverse primer	TGC AGA ACT GTT TGC CAT TCC	81 bp	AF262963
VEGFR-1 dog- TaqMan Sonde	AAA GGC TGA GCA TTA CTA AAT CTG CCT		AF262963
VEGFR-2 dog forward primer	TGA CAT GGG CTC GGT CAT T	75 bp	NM_001048024
VEGFR-2 dog reverse primer	TGT TGG TCG CTA ACA GAA GCA	75 bp	NM_001048024
VEGFR-2 dog- TaqMan Sonde	CTA CGT TCA AGA TTA CAG GTC TCC ATT		NM_001048024

2.2.4.3 Protokoll der Real Time RT-PCR für VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2

Bei der Durchführung der Real Time PCR wurde der TaqMan® qPCR MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgien) eingesetzt. Die jeweiligen Proben wurden auf eine Standard-Verdünnung der RNA-Lösung von 200 ng/μl gebracht und daraufhin der DNase-Behandlung unterzogen. Diese und die Reverse Transkription (RT) erfolgten nach den in Kapitel 2.2.3.5. beschriebenen Protokollen. In Tabelle 20 ist die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Real Time PCR dargestellt. Zu 20 μl Reaktionsansatz wurden 5 μl cDNA-Lösung aus dem RT-Ansatz zugegeben. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Real Time RT-PCR

Komponenten	Einfacher Ansatz (in μl)	Stammlösung
qPCR Master Mix	12,5 μl	2x
Sense-Primer	1,5 μl	5 μM
Antisense-Primer	1,5 μl	5 μM
TaqMan-Sonde	1 μl	5 μM
DEPC-Wasser	3,5 μl	
Gesamtvolumen	20 μl	

Durchgeführt wurde die Real Time PCR in dem automatischen Fluorometer ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter Verwendung von 96-well optical plates (Applied Biosystems, Darmstadt).

Die Amplifikation wurde bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Programmschritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sek	40 Wiederholungen
Annealing= T_A und Verlängerung	60°C	1 min	

2.2.4.4 Auswertung

Die ermittelte Quantifizierung der Expression eines Gens durch die Real Time PCR lässt sich in eine absolute und eine relative Quantifizierung unterscheiden. Bei der absoluten Quantifizierung ermittelt man die absolute Menge, also die Anzahl der Kopien eines Gens. In dem Fall benötigt man zur Erstellung einer Regressionsgeraden einen genauen Standard, zum Beispiel eine definierte Menge von Plasmid-DNA des entsprechenden Gens.

Bei der relativen Quantifizierung wird der Anstieg beziehungsweise der Abfall des Zielgens in Bezug auf ein Referenzgen ermittelt. Darum sollte das Housekeeping-Gene, welches zur Normierung der Daten verwendet wird, nicht reguliert sein, das heißt es sollte ein konstantes Expressionsniveau in verschiedenen Geweben, Stadien und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen besitzen. Die Voraussetzung zur Anwendung der relativen Quantifizierung ist, dass Ziel- und Referenzgen-PCR vergleichbare Reaktionseffizienzen zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der relativen Quantifizierung angewendet. Dabei wurde das Housekeeping-Gene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)

nach Angaben des Herstellers von ABI PRISM™ 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) als Referenzgen eingesetzt.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder C_T -Wert. Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei welchem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Zu Beginn der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, denn normalerweise ist die Fluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen nicht detektierbar. Der C_T -Wert definiert also jenen Zeitpunkt, ab dem die Amplifikation und damit die Bildung von Doppelstrang-cDNA exponentiell ist. In dieser Phase wird die PCR-Reaktion von keinen limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel oder nachlassende Enzymaktivität eingeschränkt. Der C_T -Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich in die Reaktion eingebrachten cDNA-Kopienzahl des entsprechenden Gens. Die erforderliche Anzahl an Zyklen, die nötig sind, bis das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrund detektierbar ist, ist umso geringer, je mehr cDNA-Template initial vorhanden ist.

Die Bestimmung der relativen Expression setzt sich aus drei Formeln zusammen.

Als erstes wird der Unterschied an Thresholdzyklen für die Zielsequenz und das Referenzgen berechnet. Dabei wird auf das Housekeeping-Gene GAPDH normalisiert.

1. Formel:
$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ GAPDH}}$$

Bevor die relative Expression bestimmt werden kann, muss zunächst $\Delta \Delta C_T$ bestimmt werden. Hierfür wird ein Kalibrator ausgewählt. Als Kalibrator wird diejenige Probe bezeichnet, bei welcher die Expression am niedrigsten war (also die Probe mit dem höchsten ΔC_T -Wert). Der ΔC_T -Wert des Kalibrators wird von den ΔC_T -Werten aller Proben abgezogen (2. Formel).

2. Formel:
$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ Kalibrator}}$$

Mit Hilfe des $\Delta \Delta C_T$ kann dann die relative Gen-Expression (RGE) bestimmt werden (3. Formel).

3. Formel:
$$RGE = 2^{(-\Delta \Delta C_T)}$$

Die relative Gen-Expression gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zu der Probe mit der niedrigsten Expression (Kalibrator) an.

2.2.4.5 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistical Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

Zur statistischen Berechnung der VEGF-, VEGFR-1- und VEGFR-2- mRNA-Expression wurde eine einfaktorielle Varianz-Analyse (parametrische ANOVA) durchgeführt. An die Varianzanalyse schloss sich ein paarweiser Mittelvergleich mit Hilfe des Tukey-Kramer's Tests an.

2.2.5 Herstellung Digoxigenin-markierter Ribosonden

Zur Sondenherstellung für die RNA/RNA in situ Hybridisierung wurden die Amplifikate der RT-PCR als Matrize verwendet. Zur Detektion der mRNA von VEGF wurden folgende, von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg hergestellte Primer verwendet:

Tabelle 21: Primersequenz, Amplifikatgröße und NCBI Accession Nummer

Primer	Primersequenzen (5'→ 3')	Amplifikat- größe	NCBI Acc.-Nr.
VEGF forward primer	TGT AAT GAC GAA AGT CTG CAG	186 bp	M31836
VEGF reverse primer	TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA	186 bp	M31836

2.2.5.1 Ligation der PCR-Produkte

Initial wurden die PCR-Amplifikate in einem Gel aufgereinigt. Hierzu wurde ein 2%iges, mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel und ein Kamm mit großen Slots verwendet. Die gewünschten Banden wurden dann unter UV-Licht-Kontrolle (High Performance Ultraviolett Transilluminator; Ultra Violet Products, Cambridge, UK) mit einem sterilen Skalpell aus

dem Gel ausgeschnitten. Zur Extraktion und Reinigung der cDNA aus dem Gel wurde der QIAEX II Gel-Extraktionskit (150) (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

Protokoll (nach Angaben des Herstellers):

- Abwiegen des Gelstücks in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube
- Zugabe von 6x Volumen Puffer QX1 zu 1x Volumen/Gewicht des Gelstücks
- QIAEX II-Lösung resuspendieren (30 sec gut vortexen)
- 30 µl QIAEX II-Lösung zupipettieren, vortexen
- Inkubation für 10 min bei 50°C in Wasserbad; während der Inkubation alle 2 min kurz vortexen
- 30 sec bei 13000 UpM zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 500 µl Puffer QX1 dazugeben, mischen
- 30 sec bei 13000 UpM zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 500 µl Puffer PE dazugeben, mischen
- 30 sec bei 13000 UpM zentrifugieren, Überstand verwerfen, diesen Schritt 1x wiederholen
- Pellet trocknen (10-15 min bei 37°C)
- 20 µl DEPC-Wasser zupipettieren, mischen
- 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 30 sec bei 13000 UpM zentrifugieren → DNA im Überstand

Die im DEPC-Wasser gelösten gereinigten DNA-Fragmente dienen direkt als Insert für die Ligation. Die Durchführung der Ligation erfolgte mit einem pGEM®-T-Vektor System I (Promega GmbH, Mannheim). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C im Wasserbad inkubiert.

Tabelle 22 führt die Zusammensetzung des Ligationsansatzes auf.

Tabelle 22: Komponenten zur Ligation der PCR-Produkte in den pGEM®-T-Vektor (Ligationsansatz)

Komponenten	Ligationsansatz
2x Ligationspuffer (Promega)	5 µl
pGEM®-T-Vektor (50 ng/µl) (Promega)	1 µl
PCR-Produkt (Insert)	3 µl
T4-DNA-Ligase (3 U/µl) (Promega)	1 µl

2.2.5.2 Transformation der Plasmide in E. coli XL1-Blue Bakterienstämmen

Herstellung kompetenter XL1-Blue Zellen:

Für die Klonierung der Plasmide mussten zunächst die kompetenten XL1-Blue Zellen (Stratagene, Heidelberg) hergestellt werden.

Dies erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Lösung von je einer Bakterienkultur in 2 ml LB-Medium
- Inkubation unter Bewegung bei 37°C über Nacht
- Zugabe von 500 µl dieser „Übernachtskultur“ zu 19,5 ml LB-Medium; Inkubation unter Bewegung bei 37°C für eine Stunde
- Abkühlung der Zellsuspension auf Eis für 30 min
- Zentrifugation der Zellsuspension bei 8000 UpM für 5 min, Überstand verwerfen
- Lösung des Pellets in 10 ml einer Kalziumchlorid-Lösung (50 mM)
- 60 min auf Eis bringen; in dieser Zeit Lösung mehrmals schütteln bis zur vollständigen Lösung des Pellets
- Zentrifugation bei 8000 UpM für 5 min, Überstand verwerfen
- Resuspendierung des Pellets in 3 ml Kalziumchlorid-Lösung (50 mM)
- Die so gewonnenen kompetenten Zellen können bis zu 3 Tagen bei 4°C gelagert werden

Transformation des Plasmids in E. coli XL1-Blue:

- Vermischung von 100 µl der kompetenten Zellen mit 10 µl des Ligationsproduktes (Plasmide)
- Inkubation auf Eis für 30 min
- Inkubation bei 42°C für 2 min
- Verbringung für 2 min auf Eis
- Vermischung der Plasmidsuspension mit 300 µl LB-Medium (enthält 30 µg/ml Tetrazyklin; Sigma, Taufkirchen, vorgewärmt auf 37°C)
- Inkubation bei 37°C für 30 min
- Präparation der LB-Medium-Agarplatten (mit 30 µg/ml Tetrazyklin und 100 µg/ml Ampicillin; Sigma,) für die sogenannte Blau-Weiß-Selektion: pro Platte werden 40 µl X-Gal (20 mg/ml; Sigma) und 40 µl IPTG (200 mg/ml; Sigma) ausgestrichen
- Trocknung der Platten bei 37°C für 30 min

- Ausstreichen von 130 µl der Plasmid-Medium-Lösung pro Agarplatte
- Inkubation bei 37°C über Nacht

Durchführung der Ligation mit pGEM®-T-Vektor System I:

Der Sitz der Schnittstelle befindet sich inmitten des lacZ'-Gens, welches für einen Teil (α -Fragment) der β -Galactosidase kodiert. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside) ist ein Substrat dieses Enzyms, welches hydrolytisch zum Indoxyl gespalten wird. Dieses wasserlösliche, gelbe 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl wird durch Oxidation zum wasserunlöslichen, tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo. Durch Einbau (Ligation) des DNA-Fragmentes in den Vektor wird die Gensequenz der β -Galactosidase unterbrochen, wodurch das Enzym nicht mehr exprimiert werden kann. Daraus folgt, dass X-Gal nicht mehr gespalten wird und somit auch kein blauer Farbstoff mehr entsteht. Dies ermöglicht, dass man zwischen Kolonien mit leerem Vektor und solchen mit eingebautem Vektor unterscheiden kann: die nach der Transformation entstandenen Kolonien erscheinen weiß, die Kolonien mit leerem Vektor erscheinen blau. Man erkennt die Kolonien mit eingebautem DNA-Fragment also an ihrer weißen Farbe. Man bezeichnet dies als Blau-Weiß-Selektion, und sie dient zur Kontrolle ob die Bakterien das Plasmid aufgenommen haben (Ruther et al. 1981).

Durch IPTG (Isopropylthiogalactosid), ein Induktor der bakteriellen RNA-Polymerase, der zur Transkription des lacZ'-Gens führt, kann diese Reaktion gezielt induziert werden. Des weiteren enthält der Vektor ein Antibiotikaresistenzgen (gegen Ampicillin), welches bewirkt, dass auf einem mit Ampicillin versetzten Medium nur ein mit diesem Vektor transformiertes Bakterium wachsen kann.

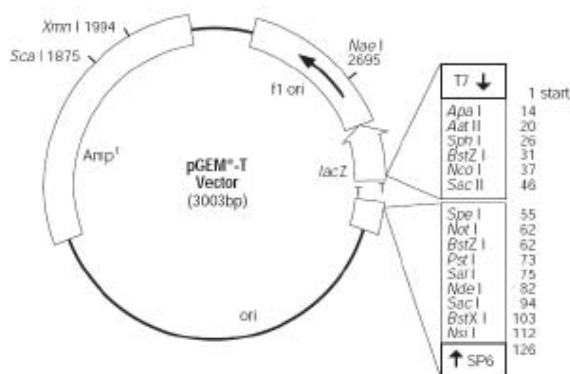


Abbildung 4: Schema des pGEM®-T-Vektors

Demzufolge wurden die weißen Bakterienkolonien von den LB-Medium-Agarplatten ausgewählt und mit einer Pipettenspitze wurde je eine Bakterienkolonie in 3 ml LB-Medium (versetzt mit 500 ml 1%iger Ampicillinlösung) überführt. Danach erfolgte eine Inkubation dieser Suspension über Nacht bei 37°C unter Bewegung.

2.2.5.3 Plasmidextraktion und Restriktionsanalyse

Zur Extraktion der Plasmide aus den kompetenten Zellen wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH) verwendet.

Protokoll (nach Angaben des Herstellers):

- 2 ml der „Übernachtskultur“ bei 8000 UpM und 4°C 2 min zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Erneute Zugabe von 2 ml der „Übernachtskultur“, Zentrifugation bei 8000 UpM und 4°C 2 min, Überstand verwerfen
- Lösung des Pellets in 250 µl P1-Puffer
- Zugabe von 250 µl P2-Puffer (Lysis-Puffer), 3-6x vorsichtig kippen
- Zugabe von 350 µl N3-Puffer (Neutralisations-Puffer), 3-6x vorsichtig kippen
- Zentrifugation bei 13000 UpM und 4°C, 10 min → Plasmid befindet sich im Überstand
- Überstand in QIAprep Spin Columns pipettieren und 1 min bei 13000 UpM zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 0,75 ml PE-Puffer (Wasch-Puffer) zupipettieren und 1 min bei 13000 UpM zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- QIAprep Spin Columns auf ein neues, steriles 1,5 ml Eppendorf-Tube geben, 50 µl EB-Puffer zugeben und 1 min bei 13000 UpM und 4°C zentrifugieren
- Inhalt des Eppendorf-Tube (= Plasmid) in ein neues, steriles 1,5 ml Eppendorf-Tube geben und bei -20°C im Gefrierschrank lagern

Durchführung eines Doppelverdaus zur Überprüfung der richtigen Länge der Inserte:

Verwendet wurden die Restriktionsendonukleasen Not I und Nco I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main) sowie deren spezielle Puffer NEBuffer 3 und 4 (New England

Biolabs GmbH). Der Reaktionsansatz von 20 µl setzte sich wie in Tabelle 23 beschrieben zusammen.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Doppelverdau

Komponenten	Ansatz für Doppelverdau
Aqua bidest. (steril)	10 µl
Plasmid-DNA	5 µl
BSA (Roth)	1 µl
Not I (10 U/µl)(New England Biolabs)	1 µl
Nco I (10 U/µl)(New England Biolabs)	1 µl
NEBuffer 3 (für Not I) (New England Biolabs)	1 µl
NEBuffer 4 (für Nco I) (New England Biolabs)	1 µl

Es erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für zwei Stunden bei 37°C. Im Anschluss wurde eine horizontale Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarose-Gel bei einer konstanten Spannung von 120 Volt durchgeführt. Sie diente der Kontrolle des Doppelverdaus und der korrekten Größe des Inserts. Die Banden des Inserts und des Vektors wurden unter UV-Licht mit einem Transilluminator sichtbar gemacht.

2.2.5.4 Sequenzierung des Plasmids

Mittels Sequenzierung der Plasmide in einem kommerziellen Labor (QIAGEN Genomic Services; QIAGEN GmbH) wurde die korrekte Ligation und Transformation bestätigt.

2.2.5.5 In vitro Transkription

Vor der Transkription (Herstellung von RNA, bei der die DNA als Matrize dient) muss zuerst eine Linearisierung der Plasmide durchgeführt werden. Hierzu wurde die Restriktionsendonuklease Not I für die Transkription mit der T7-RNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) verwendet, die Restriktionsendonuklease Nco I für die Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim). Pro Plasmid muss ein Reaktionsansatz für Not I und ein Reaktionsansatz für Nco I hergestellt werden. Der Reaktionsansatz setzt sich wie in Tabelle 24 beschrieben zusammen.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Plasmidlinearisierung mit Not I/ Nco I

Komponenten	Not I-Ansatz	Nco I-Ansatz
Aqua bidest. (steril)	10 µl	12 µl
Plasmid-DNA	5 µl	5 µl
BSA (Roth GmbH)	2 µl	-
Not I (10 U/µl) (New England Biolabs)	1 µl	-
Nco I (10 U/µl) (New England Biolabs)	-	1 µl
NEBuffer 3 (für Not I) (New England Biolabs)	2 µl	-
NEBuffer 4 (für Nco I) (New England Biolabs)	-	2 µl

Es erfolgte eine Inkubation der Ansätze für zwei Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen 20 Minuten bei 65°C erhitzt.

Zur Markierung der RNA-Sonden mit Digoxigenin bei der Transkription wurde ein Dig-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Tabelle 25 zeigt die Reaktionsansätze für die Transkription der Linearisierungsprodukte aus der Reaktion mit Not I und Nco I.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Reaktionsansätze

Komponenten	Transkription / Not I	Transkription / Nco I
DEPC-Wasser	8 µl	8 µl
5x Transkriptionspuffer (Promega)	4 µl	4 µl
10x Dig-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics)	2 µl	2 µl
100 mM DTT (Promega)	2 µl	2 µl
Linearisierungsprodukt	2 µl	2 µl
T7-RNA-Polymerase (Promega)	2 µl	-
SP6-RNA-Polymerase (Promega)	-	2 µl

- Es erfolgte eine Inkubation der Ansätze für eine Stunde bei 37°C.
- Zugabe von 0,5 µl EDTA (0,5 M), 1,2 µl Lithiumchlorid (8 M) und 70,7 µl absoluter Ethanol pro Ansatz
- Inkubation bei -80°C für eine Stunde

- Zentrifugation bei 14000 UpM und 4°C, 15 min lang; Überstand verwerfen
- Zugabe von 200 µl 70%igem Ethanol
- Zentrifugation bei 14000 UpM und 4°C, 10 min lang; Überstand verwerfen
- Trocknen des Pellets bei 37°C
- Zugabe von 50 µl DEPC-Wasser zur Lösung der Dig-markierten RNA-Sonde
- Inkubation der Lösung bei 70°C für 10 min
- Lagerung der Sonde bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch

2.2.6 In situ Hybridisierung (ISH)

Die In situ Hybridisierung erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) an Gewebeschnitten. Diese Methode hat gegenüber der PCR den Vorteil, dass sie eine präzise Lokalisierung der gesuchten „Ziel-Nukleinsäure“ im Gewebe selbst, also *in situ*, ermöglicht. Sie wurde zur Untersuchung der Lokalisation der VEGF-Expression auf mRNA-Ebene verwendet.

2.2.6.1 Vorbemerkungen

Das sterile Arbeiten bis zur Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz im Gewebe ist für das Gelingen der ISH wichtig. Aus diesem Grund wurden alle verwendeten Glaswaren mit Alufolie abgedichtet und 4 Stunden bei 180°C sterilisiert. Die verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt, was Kontaminationen mit RNase vermeiden soll, und sie wurden vor ihrem Gebrauch autoklaviert. Außerdem wurden bei der Durchführung der ISH immer Einmalhandschuhe getragen.

Von den in Paraffin eingebetteten Plazentaprobe wurden 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und diese wurden in einem 37°C warmen Wasserbad auf SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Teningen) aufgezogen.

2.2.6.2 Protokoll der ISH zum Nachweis von VEGF

- Entparaffinieren der Gewebeschnitte in Xylol: 5 min bei 60°C, 2x 5 min bei RT
- Rehydrierung der Gewebeschnitte in einer absteigenden Ethanolreihe: 2x 5 min in 100%igem Ethanol, 5 min in 96%igem Ethanol, 5 min in 70%igem Ethanol
- Waschen der Objektträger in DEPC-Wasser
- Inkubation in 0,2 n HCl-Lösung für 20 min zur Permeabilisierung der Membranen
- Inkubation in 2x SSC-Lösung bei 70°C für 15 min
- Waschen in 1x PBSM
- Inkubation mit Proteinase K (20 µg/ml, Roth GmbH) bei 37°C für 20 min in feuchter Kammer; dient der Gewebepermeabilisierung
- Abstoppen der Proteinase K-Reaktion: 5 min in 0,2%iger Glyzin-Lösung
- Blockade unspezifischer Hintergrundreaktionen: 15 sec in 20%iger Essigsäure
- Waschen in 1x PBSM
- Nachfixierung der Gewebeschnitte: 10 min in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung
- Waschen in 1x PBSM
- Prähybridisierung: 45-60 min in 20%igem Glycerol
- Waschen in 2x SSC-Lösung
- Vorbereiten des Sondenansatzes und des Hybridisierungspuffers:
- Sondenansatz: 2 µl Salmon-Sperm (Sigma, Taufkirchen) + 4 µl Hefe-tRNA (Sigma, Taufkirchen) + 8 µl Dig-markierte RNA-Sonde → Inkubation des Sondenansatzes bei 70°C für 12 min, danach Verbringen in Eisbad
- Ansatz für den Hybridisierungspuffer: 24 µl DEPC-Wasser + 20 µl 20x SSC-Lösung + 2 µl Denhardt's Reagenz (50 %) + 100 µl deionisiertes Formamid (Sigma) + 40 µl Dextransulfat (Sigma)
- Denaturierung und Streckung der Zielsequenzen durch Inkubation der Objektträger auf einer 70°C warmen Heizplatte für 12 min; nach der Inkubation Lagerung der Objektträger auf Eis bis zum Auftragen der Sonde
- Sonde und Hybridisierungspuffer zusammenpipettieren
- Auftragen des Sondengemischs auf den Objektträger und Abdecken mit einem Deckglas
- Inkubation der Gewebeschnitte in einer mit Formamid-getränkten Tüchern ausgelegten feuchten Kammer über Nacht bei 37°C

- Stringentes Waschen (zum Ablösen nicht perfekt gebundener Hybridmoleküle) mit 4x SSC-Lösung bei 37°C für 3x 10 min
- Stringentes Waschen mit 2x SSC-Lösung bei 60°C für 15 min
- Stringentes Waschen mit 0,2x SSC-Lösung bei 42°C für 15 min
- Stringentes Waschen mit 0,1x SSC-Lösung bei RT für 5 min
- Stringentes Waschen mit 2x SSC-Lösung bei RT für 5 min
- Waschen mit 1x TNMT für 10 min bei RT
- Inkubation mit 3%iger BSA-Lösung in 1x TNMT-Puffer für 60 min in feuchter Kammer bei RT; dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
- Ansetzen der Verdünnung des Schaf-Anti-Digoxigenin-AP Antikörpers (Fab-Fragmente, konjugiert mit alkalischer Phosphatase; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim): die Verdünnung des Antikörpers (150 U/200 µl) mit 3%igem BSA in 1x TNMT-Puffer betrug 1:4000
- Inkubation mit dem Schaf-Anti-Digoxigenin-AP Antikörper über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer
- Waschen mit 1x TNMT für 2x 10 min bei RT
- Waschen mit 1x NTB für 5 min bei RT
- Blockade unspezifischer Reaktionen der Alkalischen Phosphatase mit 2 mM Levamisol in 1x NTB für 5 min
- Auftragen des Farbstoffes NBT/BCIP (KPL, Wedel) zur Visualisierung der gesuchten Sonden-Zielsequenz-Hybride
- Inkubation mit 2 mM Levamisol in 1x NTB für 5 min
- Waschen in Aqua dest. für 5 min
- Eindeckeln der Objektträger mit Glyzeringelatine (Merck, Darmstadt)

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

3.1.1 Zytoskelettbestandteile

α -smooth muscle actin

Aktin zeigte in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien ein einheitliches Färbeverhalten. Eine deutliche Immunreaktion war grundsätzlich in den Gefäßwänden, also in den Endothelien und den glatten Muskelzellen zu sehen. Im Plazentalabyrinth zeigten zudem die Deziduazellen immer eine stark positive Reaktion für Aktin. Aufgrund ihrer periendothelialen Lokalisation werden die Aktin und Vimentin positiven Deziduazellen beim Hund im Folgenden auch als Periendothelzellen bezeichnet. In der Invasionszone waren die glatten Muskelzellen der maternalen Arterien und große polygonale Zellen zwischen dem invadierenden Trophoblasten für Aktin gefärbt. Ebenso wies das Myometrium aller untersuchten Tiere ein deutlich positives Signal auf. Zellen epithelialer Herkunft waren zu jeder Zeit negativ. Demzufolge zeigten weder die Zyto-/Synzytiotrophoblastzellen noch die Epithelien der Schicht der Drüsenkammern oder der tiefen Drüsenschicht ein positives Signal (Abbildungen 5 bis 8). Im Bereich des Randhämatoms war das Bindegewebe gefärbt, die Epithelien waren negativ (Abbildung 9). Im Verlauf der Trächtigkeit waren keine Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Expression des Aktin-Proteins festzustellen.

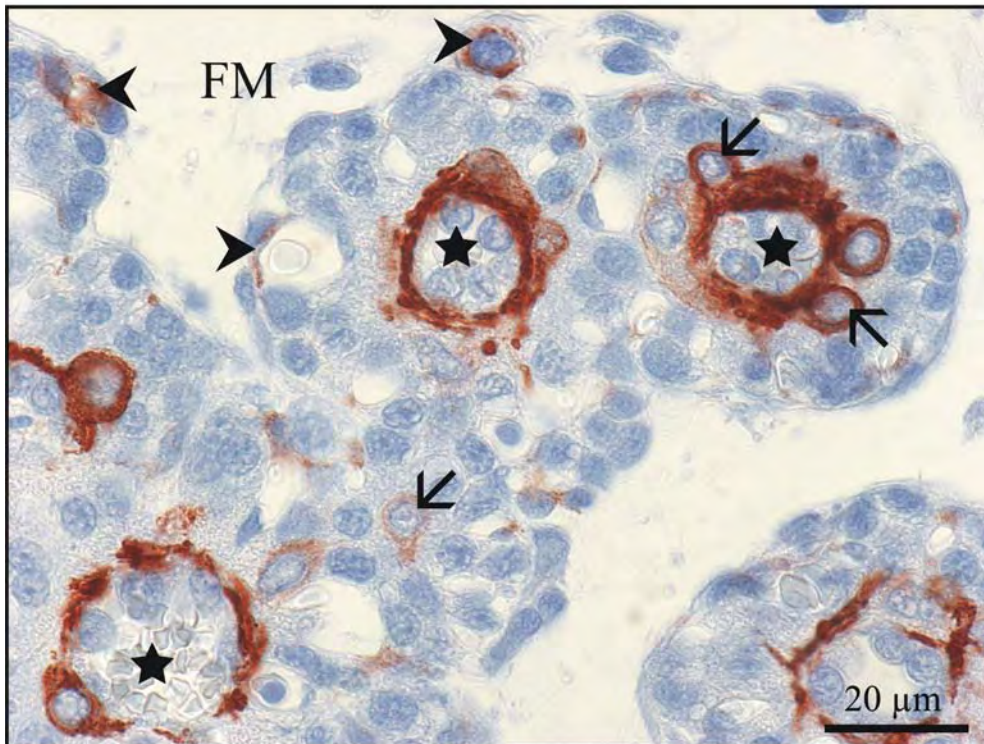


Abb. 5: Plazentalabyrinth des Hundes. Im Plazentalabyrinth sind die Gefäßwände der maternalen Kapillaren (Sterne) und die Periendothelzellen (Pfeile) stark gefärbt. Auch die fetalen Endothelzellen (Pfeilspitzen) sind positiv für Aktin. FM, fetales Mesenchym.

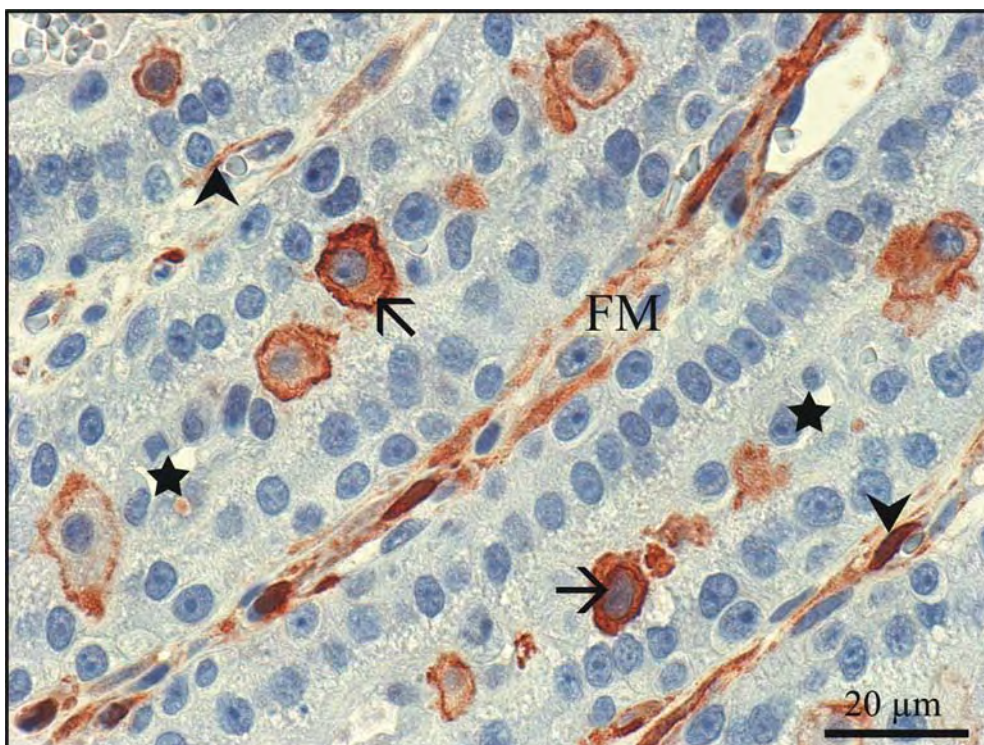


Abb. 6: Plazentalabyrinth der Katze. Im Plazentalabyrinth zeigen die Deziduazellen (Pfeile) ein positives Signal für Aktin. Auch die fetalen Endothelien (Pfeilspitzen) wurden detektiert. FM, fetales Mesenchym; Sterne, maternale Kapillaren.

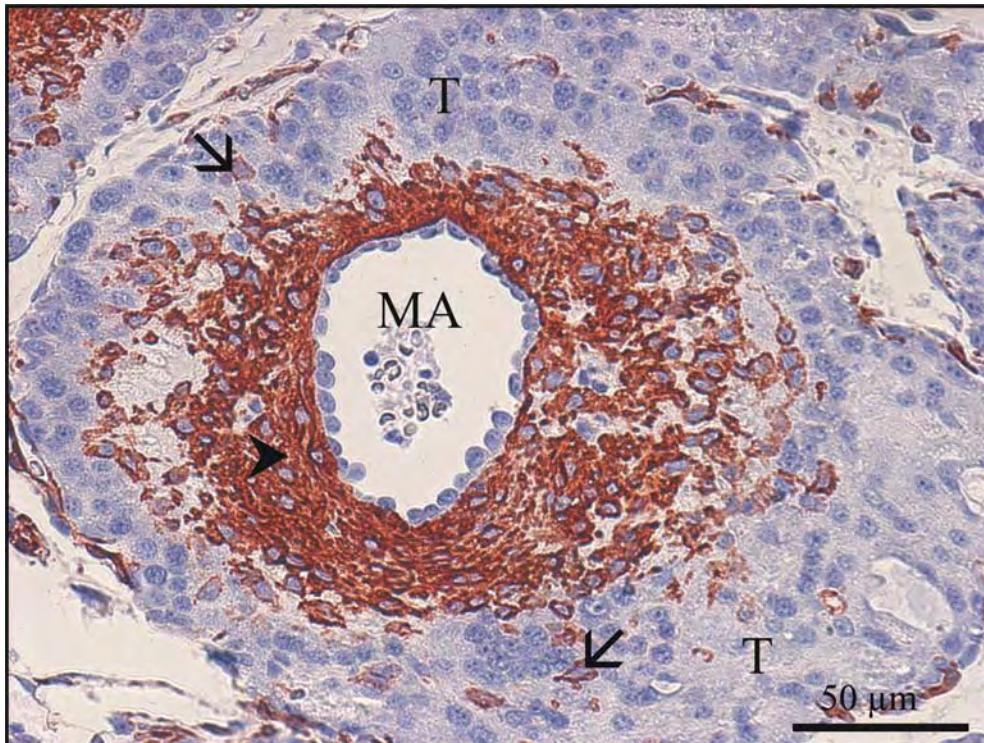


Abb. 7: Invasionszone Hund. In der Invasionszone sind die diskontinuierliche Schicht der glatten Muskelzellen (Pfeilspitze) der maternalen Arterie (MA) und große polygonale Zellen (Pfeile) zwischen dem invadierenden Trophoblasten (T) für Aktin gefärbt. Die Endothelzellen der maternalen Arterie (MA) sind negativ.

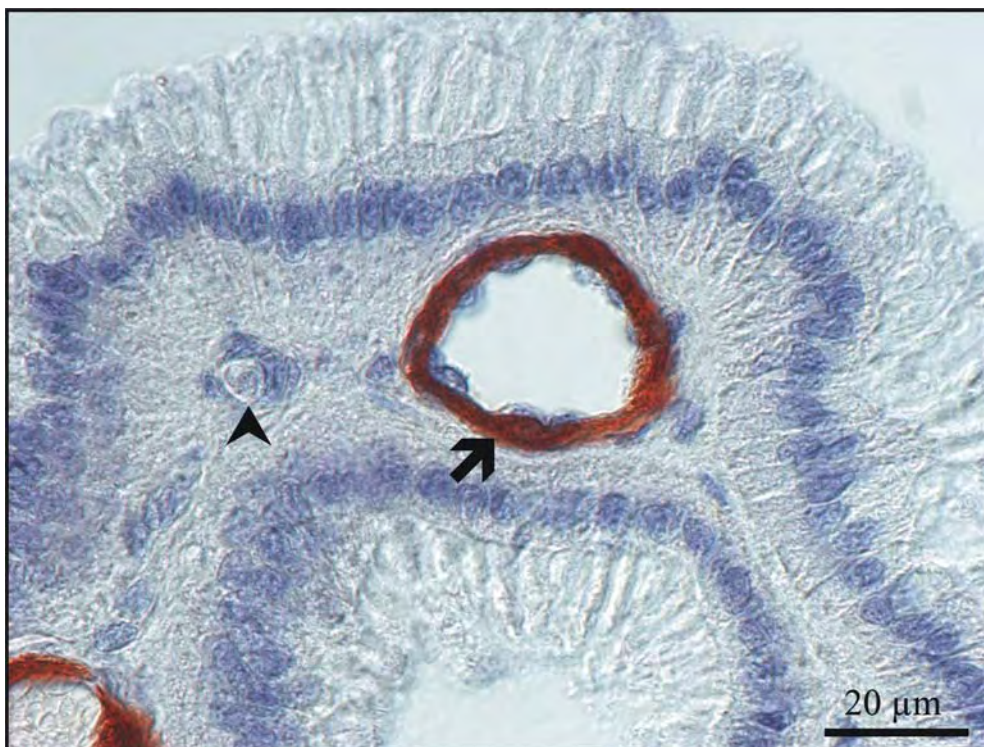


Abb. 8: Drüsenkammern des Hundes. In den Drüsenkammern färbt Aktin ausschließlich die arteriellen glatten Muskelzellen (Pfeil), wohingegen die Kapillaren (Pfeilspitze) negativ sind. Die Zylinderepithelzellen der Drüsenkammern sind ebenfalls negativ.

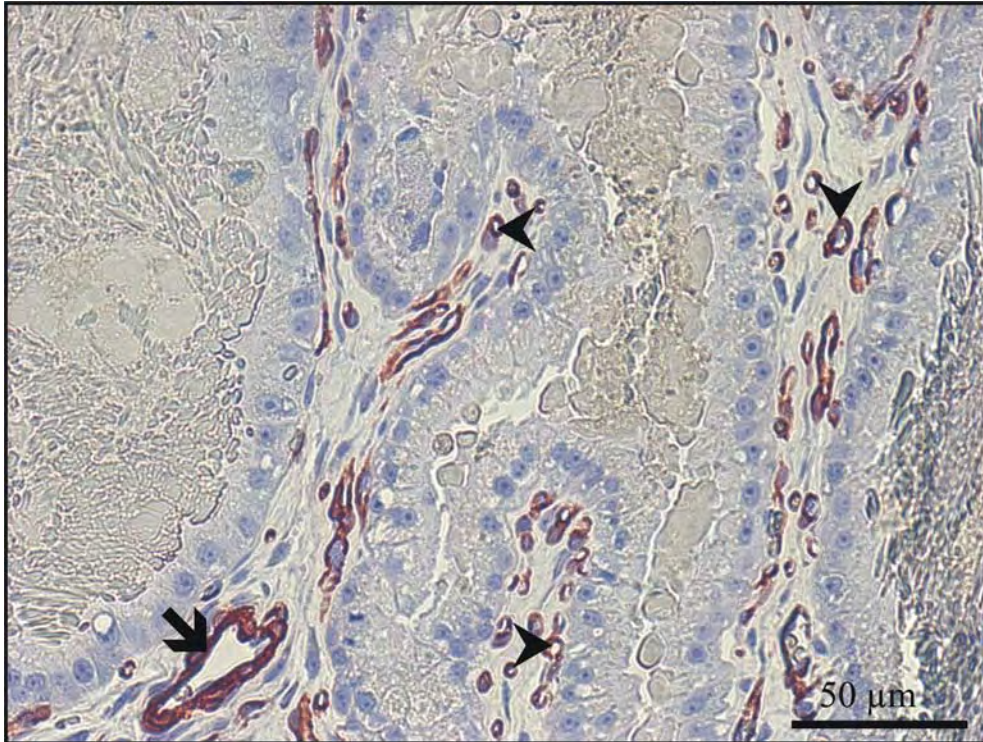


Abb. 9: Randhämatom des Hundes. Im Randhämatom zeigen sowohl die glatten Muskelzellen der Arterien (Pfeil) als auch die Kapillaren (Pfeilspitzen) eine positive Immunreaktion auf Aktin. Die Epithelzellen des Randhämatoms sind negativ.

Vimentin

Ein besonders deutliches Signal zeigte Vimentin in den Endothelien fetaler und maternaler Gefäße im Plazentalabyrinth und in den maternalen Gefäßendothelien der Invasionszone. Auch das fetale Mesenchym und maternale Bindegewebe waren merklich gefärbt. Deziduazellen und Periendothelzellen wiesen ein stark positives Signal für Vimentin auf. Ebenso färbte sich das Bindegewebe im Bereich des Randhämatoms, wohingegen dessen Epithelien keine Farbreaktion zeigten. Die Epithelien der tiefen Drüsenschicht sowie der Drüsenkammern waren, ebenso wie die Bestandteile des Trophoblasten, zu jeder Zeit der Gravidität negativ (Abbildungen 10 bis 13). Das Myometrium zeigte eine schwach positive Reaktion. Das Färbeverhalten änderte sich Laufe der Gravidität nicht, die untersuchten Graviditätsstadien wiesen ein einheitliches Bild im Färbeverhalten auf und es waren keine Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Expression festzustellen.

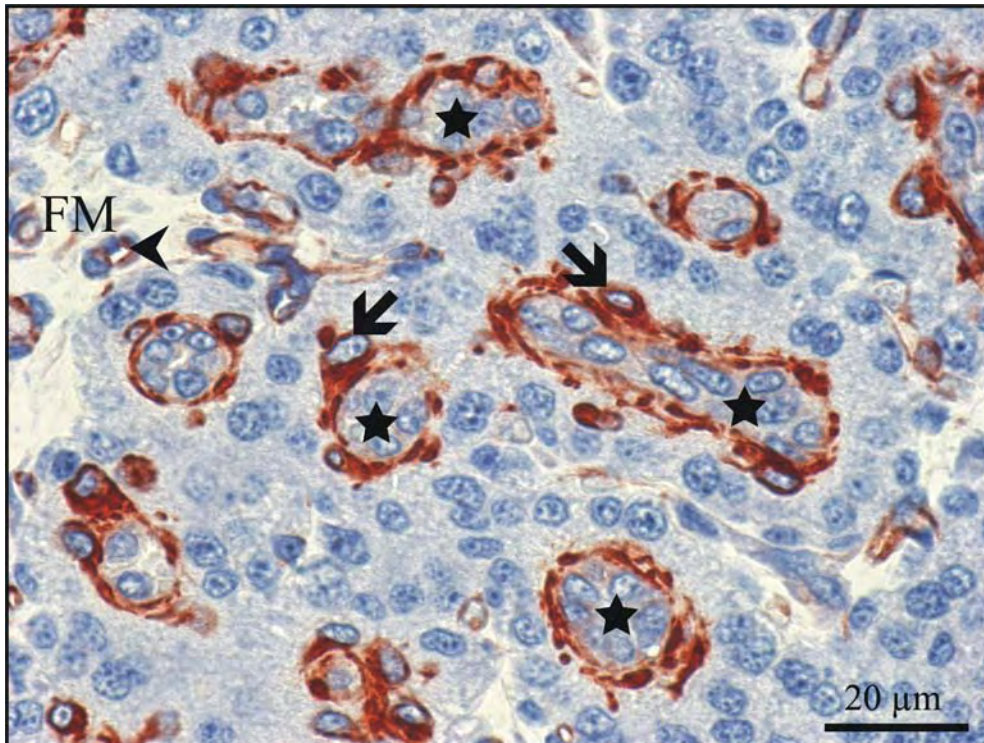


Abb. 10: Plazentalabyrinth des Hundes. Im Plazentalabyrinth färbt Vimentin die fetalen (Pfeilspitze) und maternalen (Sterne) Endothelien sowie die Periendothelzellen (Pfeile). Auch das fetale Mesenchym (FM) ist positiv.

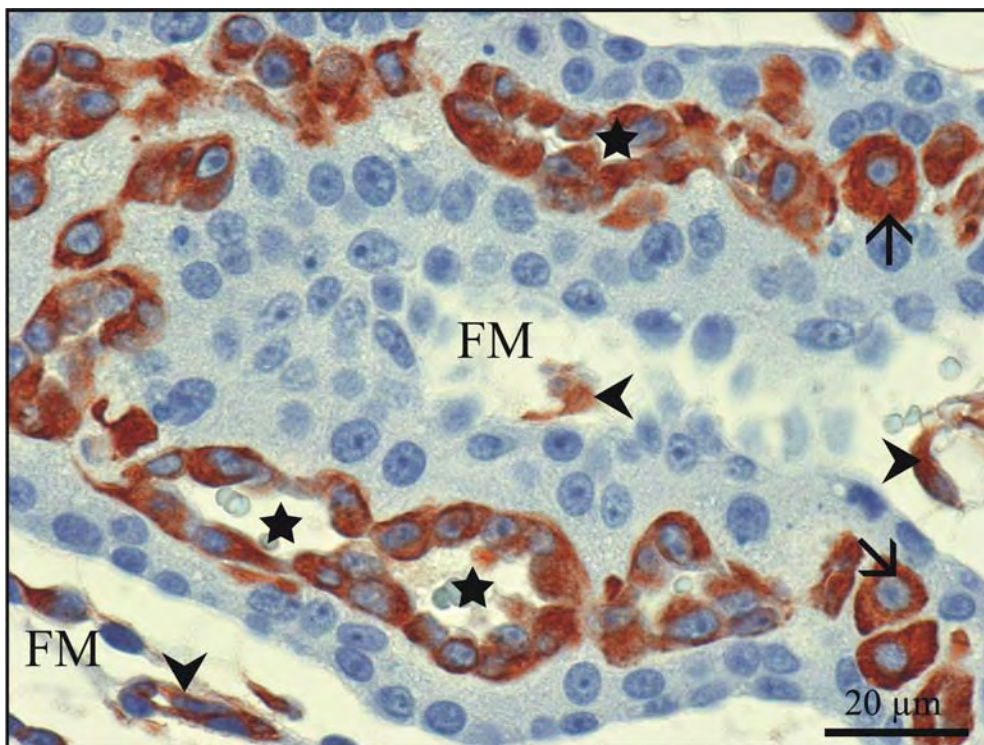


Abb. 11: Plazentalabyrinth der Katze. Im Plazentalabyrinth zeigen sowohl die fetalen (Pfeilspitzen) als auch die maternalen Endothelien (Sterne) ein positives Signal für Vimentin. Die Deziduazellen (Pfeile) und das fetale Mesenchym (FM) sind ebenfalls gefärbt.

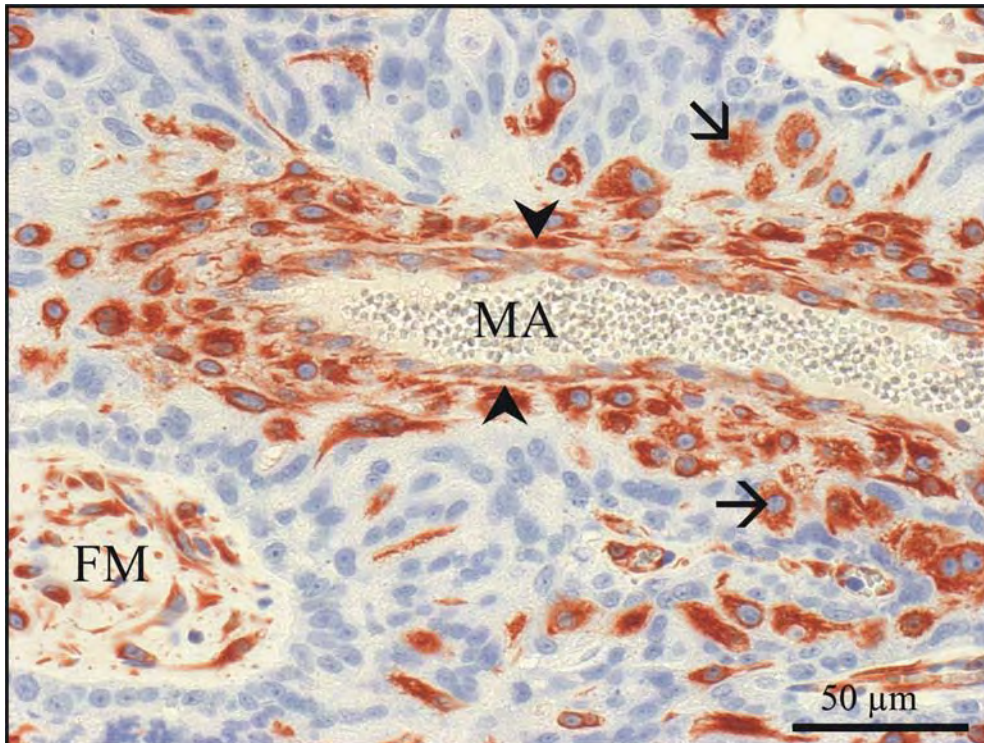


Abb. 12: Invasionszone der Katze. In der Invasionszone ist die Wand einer großen maternalen Arterie (MA) positiv für Vimentin. Dabei ist die Größe der Zellen unterschiedlich, klein im Zentrum (Pfeilspitzen) und größer in der Peripherie (Pfeile). Das fetale Mesenchym (FM) ist ebenfalls gefärbt.

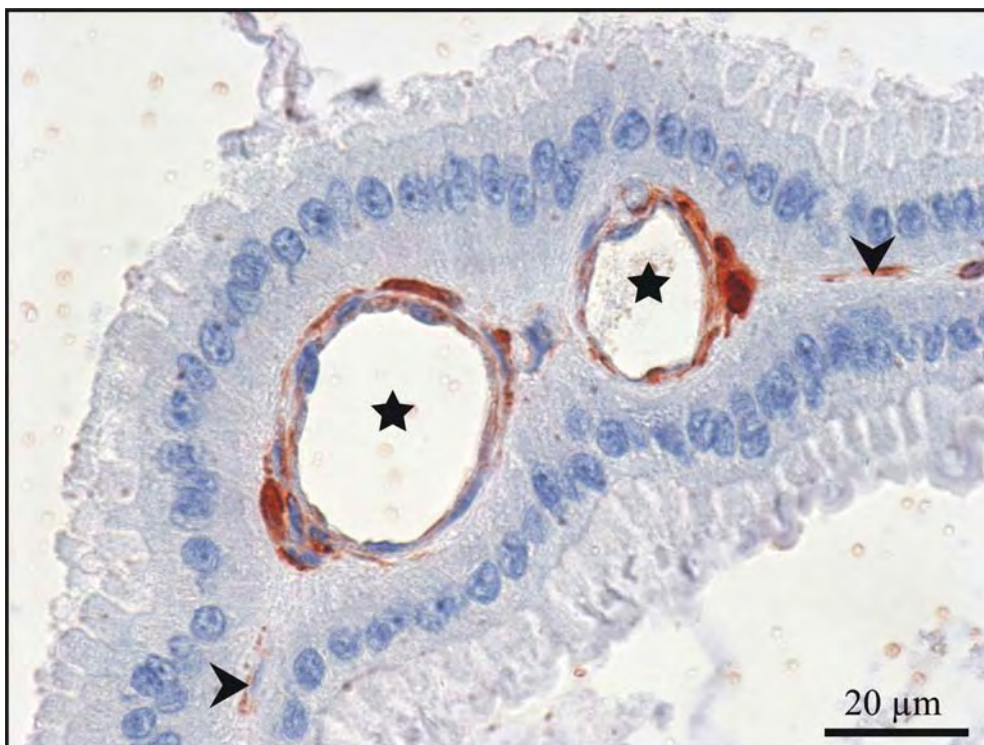


Abb. 13: Drüsenkammern des Hundes. Das Bindegewebe (Pfeilspitzen) der Drüsenkammern sowie die Endothelien der Gefäße (Sterne) zeigen eine positive Immunreaktion auf Vimentin. Die Zylinderepithelzellen dagegen sind negativ.

Zytokeratin

Zytokeratin detektierte in der endotheliochorialen Plazenta grundsätzlich die Epithelzellen. Die Epithelien der tiefen Drüsenschicht und der Drüsenkammern zeigten ein stark positives Signal (Abbildung 17). Auch im Bereich des Randhämatoms waren die Epithelien stark gefärbt (Abbildung 18). Der Synzytiotrophoblast war zu jeder Zeit stark positiv, wohingegen der Zytotrophoblast teilweise eine eher schwache bis mittlere Immunreaktion zeigte. Der invasive Trophoblast der Invasionszone war ebenfalls deutlich gefärbt. Stromazellen, fetales Mesenchym und maternales Bindegewebe, wie auch das Bindegewebe im Bereich des Randhämatoms, waren zu jeder Zeit negativ. Die Endothelien zeigten ebenfalls keine Farbreaktion. Deziduazellen und Periendothelzellen waren in jedem untersuchten Trächtigkeitsstadium negativ (Abbildungen 14 bis 16).

Das Färbeverhalten blieb im Verlauf der Gravidität gleich, es waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Trächtigkeitsstadien festzustellen.

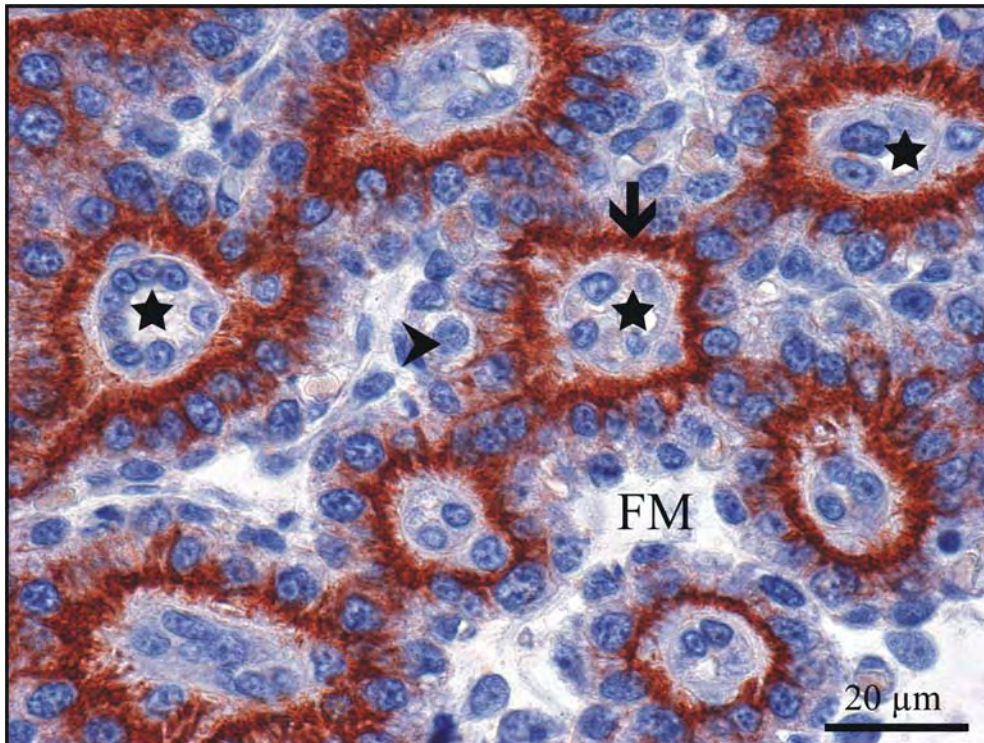


Abb. 14: Plazentalabyrinth des Hundes. Im Plazentalabyrinth färbt Zytokeratin den Synzytiotrophoblasten (Pfeil) mit hoher Intensität, wohingegen der Zytotrophoblast nur schwache Signale zeigt (Pfeilspitze). Die Endothelzellen der maternalen Kapillaren (Sterne) weisen wie das fetale Mesenchym (FM) keine Immunreaktivität auf.

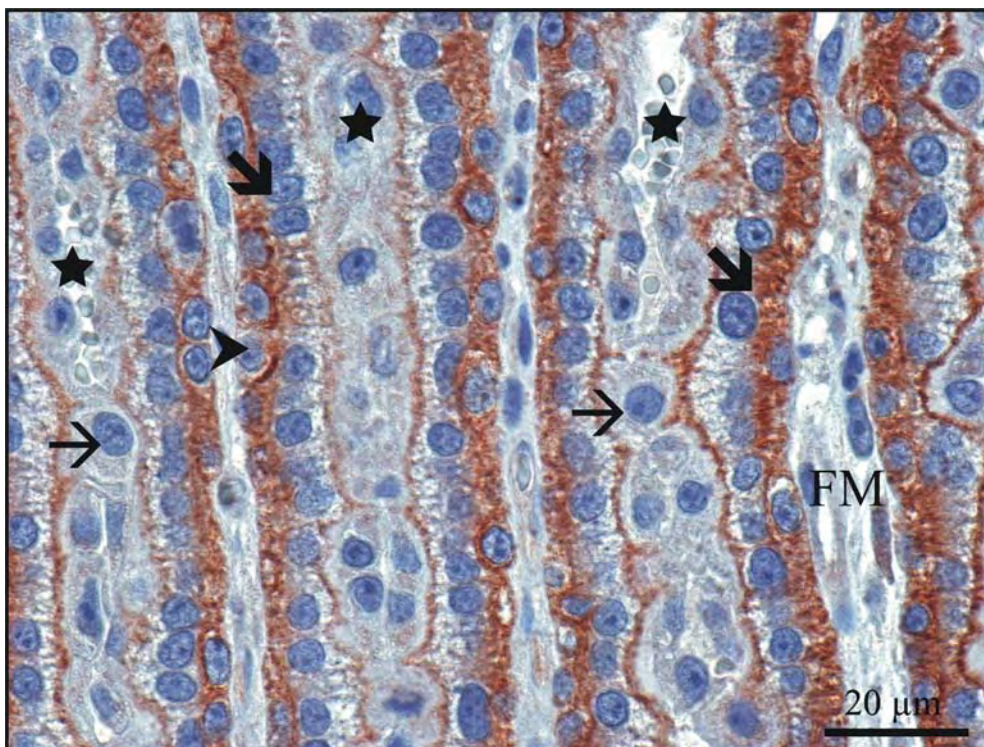


Abb. 15: Plazentalabyrinth der Katze. Im Plazentalabyrinth färbt Zytokeratin den Synzytiotrophoblasten (dicke Pfeile) und den Zytotrophoblast (Pfeilspitze). Die Endothelzellen der maternalen Kapillaren (Sterne) sowie die Deziduazellen (dünne Pfeile) und das fetale Mesenchym (FM) sind negativ.

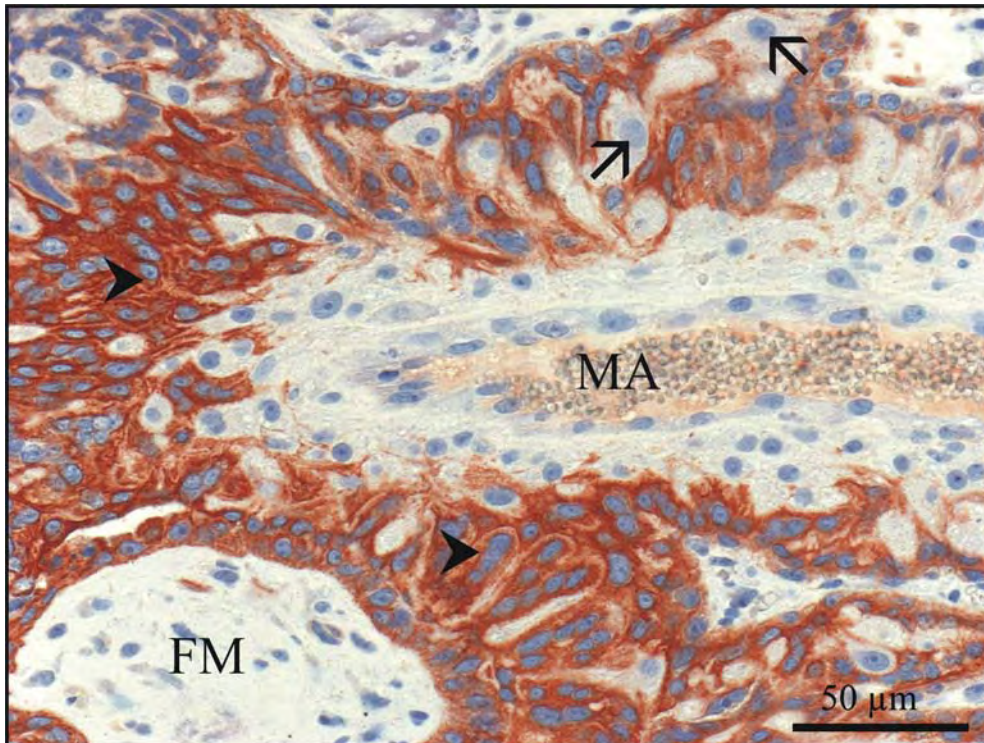


Abb. 16: Invasionszone der Katze. In Gebieten mit fortschreitender Invasion ist der Trophoblast (Pfeilspitzen), der eine große maternale Arterie (MA) invadiert, merklich gefärbt. Die Endothelzellen und die glatte Muskulatur der maternalen Arterie, das fetale Mesenchym (FM) und die Deziduazellen (Pfeile) zeigen keine Immunreaktivität für Zytokeratin.

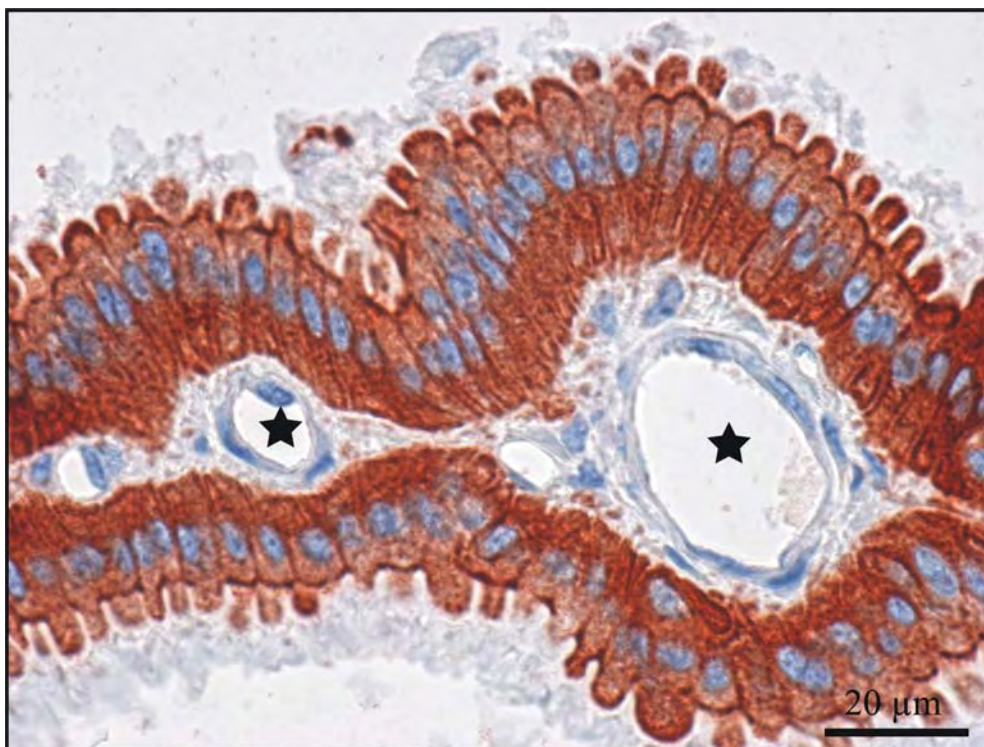


Abb. 17: Drüsenkammern des Hundes. Die Zylinderepithelzellen des Hundes haben ein stark positives Signal für Zytokeratin. Die Endothelzellen der Kapillaren (Sterne) dagegen sind eindeutig negativ.

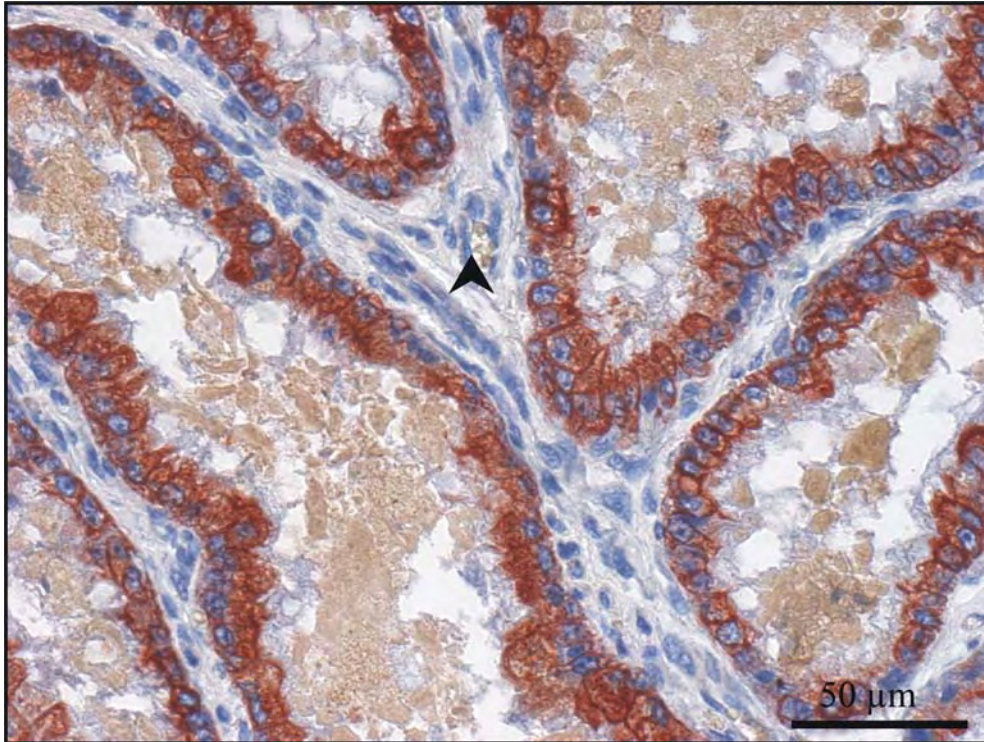


Abb. 18: Randhämatom des Hundes. Die Epithelzellen des Randhämatoms zeigen ein stark positives Signal für Zytokeratin. Die Endothelzellen der Kapillaren (Pfeilspitze) sind negativ.

3.1.2 VEGF-System

VEGF

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Spezifität des VEGF-Antikörpers überprüft. Dazu wurde eine Vorinkubation mit einem Blockierungspeptid durchgeführt, welche die Spezifität des VEGF-Antikörpers bestätigte. In diesen Kontrollen war kein Signal zu erkennen.

Das VEGF-Protein ließ sich immunhistochemisch grundsätzlich in den Endothelien der Gefäße nachweisen. Dabei waren die Endothelien der Gefäße im Bereich des Chorions oft am deutlichsten gefärbt. Zudem war bei der Katze festzustellen, dass die Farbintensität zum Ende der Gravidität hin leicht zunahm. Fetale Mesenchymzellen zeigten ebenfalls eine merkliche Färbung auf VEGF und die Periendothelzellen wiesen eine schwache Farbreaktion auf. Im Trophoblast war über den gesamten Graviditätsverlauf eine positive Immunreaktion zu beobachten. Die Intensität der Farbreaktion variierte dabei von Tier zu Tier. Teilweise färbte sich der Synzytiotrophoblast etwas stärker als der Zytotrophoblast. Der invasive Trophoblast der Invasionszone war grundsätzlich deutlich positiv. Die Deziduazellen der Katze zeigten im ersten Drittel der Gravidität eine schwach positive Reaktion, im Verlauf der Gravidität nimmt diese zu und war im letzten Drittel im Vergleich zu den ersten beiden am deutlichsten (Abbildungen 19 bis 21). Die Epithelien der Drüsenschicht und der Drüsenkammern waren zu jeder Zeit deutlich gefärbt, beim Hund war zu erkennen, dass die Epithelien der tiefen Drüsenschicht immer etwas stärker gefärbt waren als die der Drüsenkammern (Abbildung 22). Im Myometrium konnte in jedem Graviditätsstadium eine leichte bis mäßige Immunreaktion nachgewiesen werden. Im Bereich des Randhämatoms wurde in den Epithelien grundsätzlich ein stark positives Signal für VEGF detektiert (Abbildung 23).

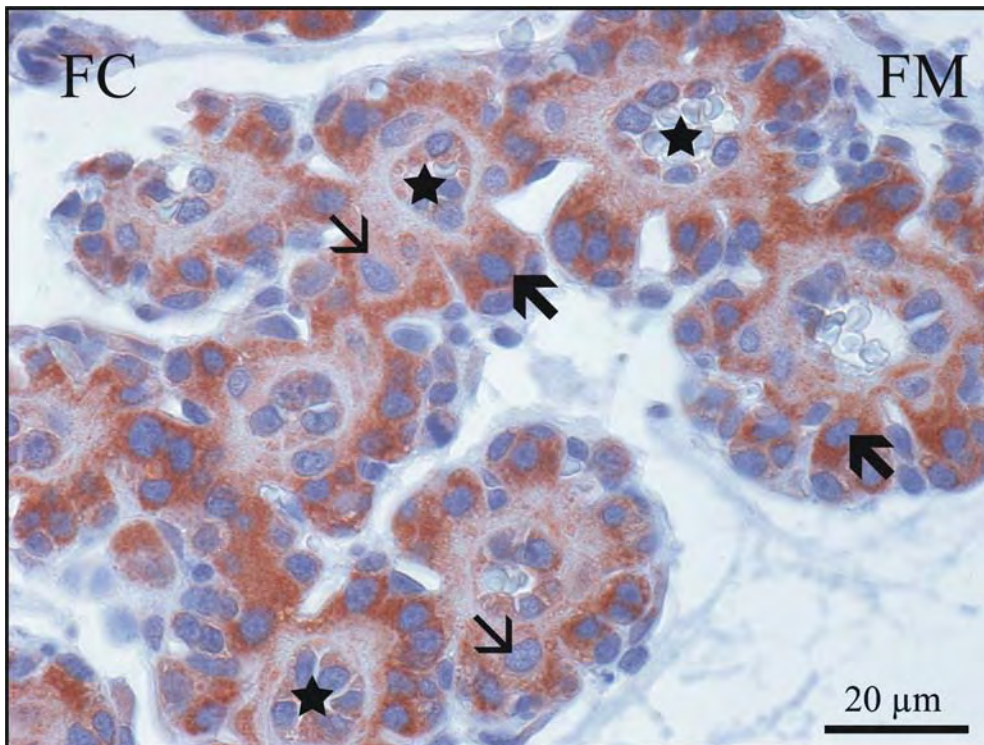


Abb.19: Plazentalabyrinth des Hundes. VEGF färbt den Trophoblasten (dicke Pfeile) und das Endothel der maternalen Kapillaren (Sterne) mit hoher Intensität. Fetale Kapillaren (FC) und fetale Mesenchymzellen (FM) zeigen ebenfalls eine positive Immunreaktion auf VEGF. Periendothelzellen (dünne Pfeile) sind schwach gefärbt.

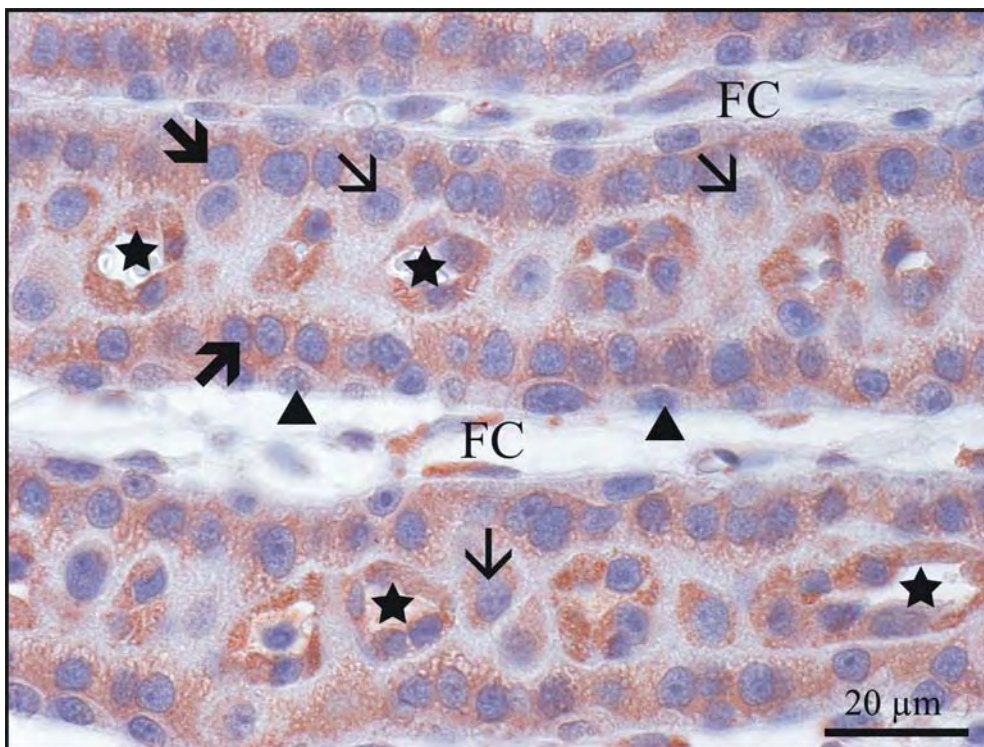


Abb.20: Plazentalabyrinth der Katze. Sowohl die maternalen (Sterne) als auch die fetalen Kapillaren (FC) zeigen eine deutliche Immunreaktivität für VEGF. Der Synzytiotrophoblast (dicke Pfeile) ist stark gefärbt, wohingegen der Zytotrophoblast (Pfeilspitzen) nur eine geringe Färbung aufweist. Die Deziduazellen (dünne Pfeile) sind mäßig bis stark positiv.

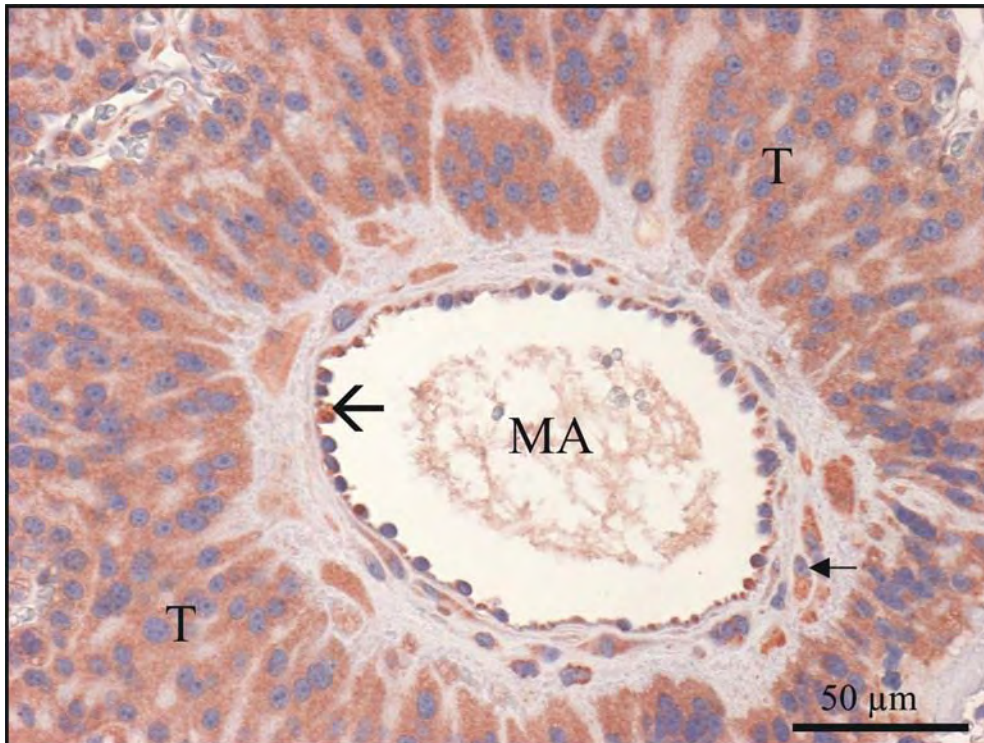


Abb. 21: Invasionszone Hund. In Gebieten mit fortschreitender Invasion ist der Trophoblast (T), welcher eine große maternale Arterie (MA) invadiert, merklich gefärbt. Die Endothelzellen (großer Pfeil) des maternalen Gefäßes exprimieren ebenfalls das VEGF-Protein, und auch die letzten noch vorhandenen glatten Muskelzellen der Gefäßwand (kleiner Pfeil) sind positiv.

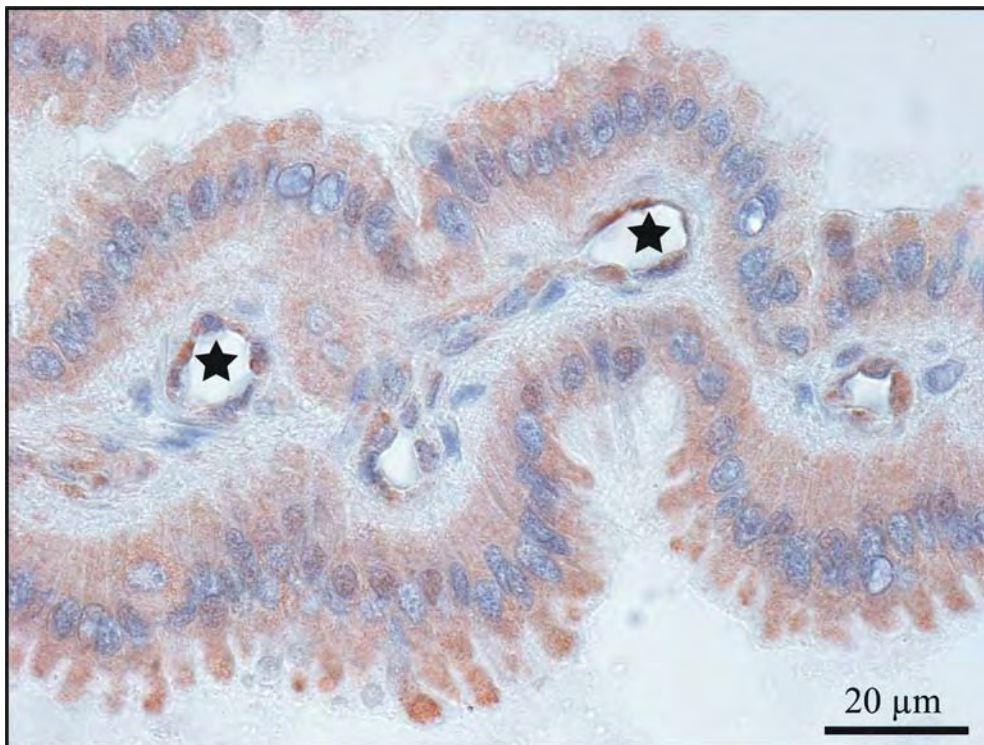


Abb. 22: Drüsenkammern Hund. Die Zylinderepithelzellen der Drüsenkammern des Hundes zeigen eine deutliche VEGF Protein-Expression und auch die Endothelien (Sterne) der maternalen Kapillaren sind eindeutig positiv.

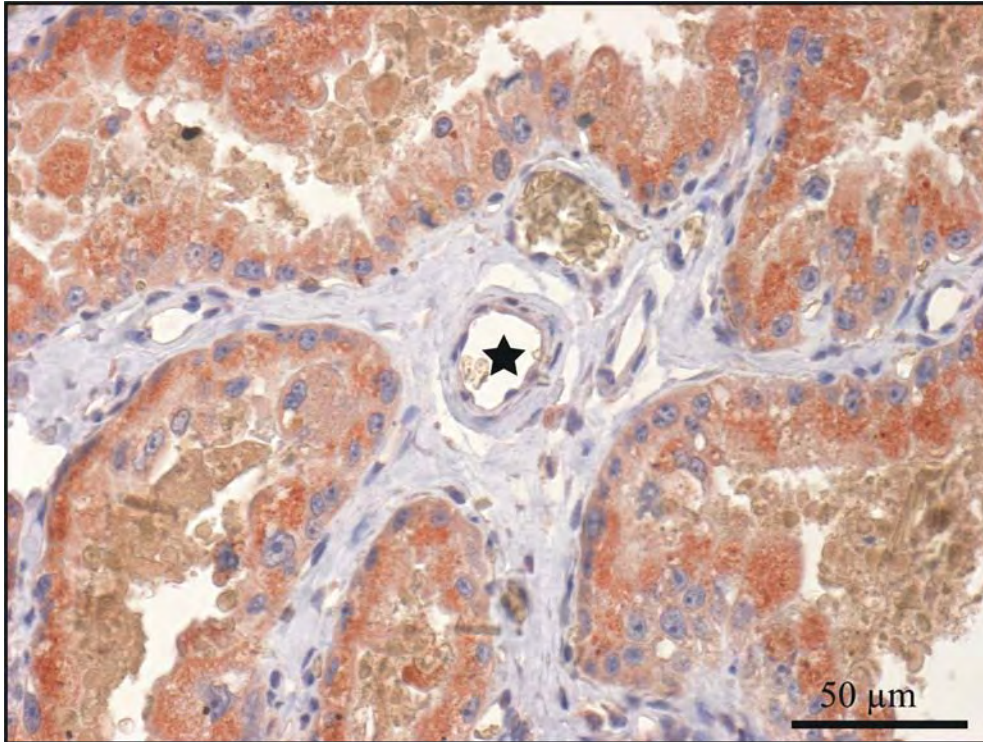


Abb. 23: Randhämatom der Plazenta des Hundes. Die Epithelzellen des Randhämatoms zeigen ein intensives positives Signal auf VEGF. Auch die Endothelzellen der Gefäße (Stern) sind gefärbt, jedoch schwächer.

VEGFR-1/Flt-1

Auch hier wurde vorab die Spezifität des Antikörpers überprüft. Dazu wurde ebenfalls eine Vorinkubation mit einem Blockierungspeptid durchgeführt, welche die Spezifität des Flt-1-Antikörpers bestätigte.

Die deutlichste Immunreaktion wurde in den Endothelien der Gefäße hervorgerufen. Die Endothelien der fetalen und maternalen Gefäße waren über die gesamte Gravidität hin intensiv gefärbt, die Immunreaktion war stärker als bei VEGF. Die fetalen Mesenchymzellen zeigten ebenfalls ein positives Signal. Die Epithelien der tiefen Drüsenschicht und der Drüsenkammern waren während der gesamten Gravidität deutlich gefärbt, bei der Katze variierte die Stärke dabei leicht von Tier zu Tier. Der Trophoblast zeigte immer eine mäßige Farbreaktion, dabei waren keine Unterschiede zwischen den untersuchten Trächtigkeitsstadien festzustellen. Die deutlichste Farbreaktion zeigte der invasive Trophoblast der Invasionszone. Auch das Myometrium zeigte während der gesamten Gravidität ein positives Signal. Die Deziduazellen der Katze waren im ersten Drittel der Gravidität nur sehr schwach gefärbt, im Laufe der Trächtigkeit war eine Zunahme in der Farbintensität festzustellen, zum Ende der Trächtigkeit zeigte sich eine mäßige Farbeaktion (Abbildungen 24 bis 27). Die Epithelien des Randhämatoms waren zu jeder Zeit der Gravidität stark positiv. Da sich dieses Bild bei VEGF und seinen Rezeptoren gleich darstellt, wird auf die Abbildung der Reaktion im Randhämatom für die VEGF-Rezeptoren verzichtet. Bei Flt-1 waren allerdings die Endothelien der Gefäße des Bindegewebes des Randhämatoms stärker gefärbt als bei VEGF.

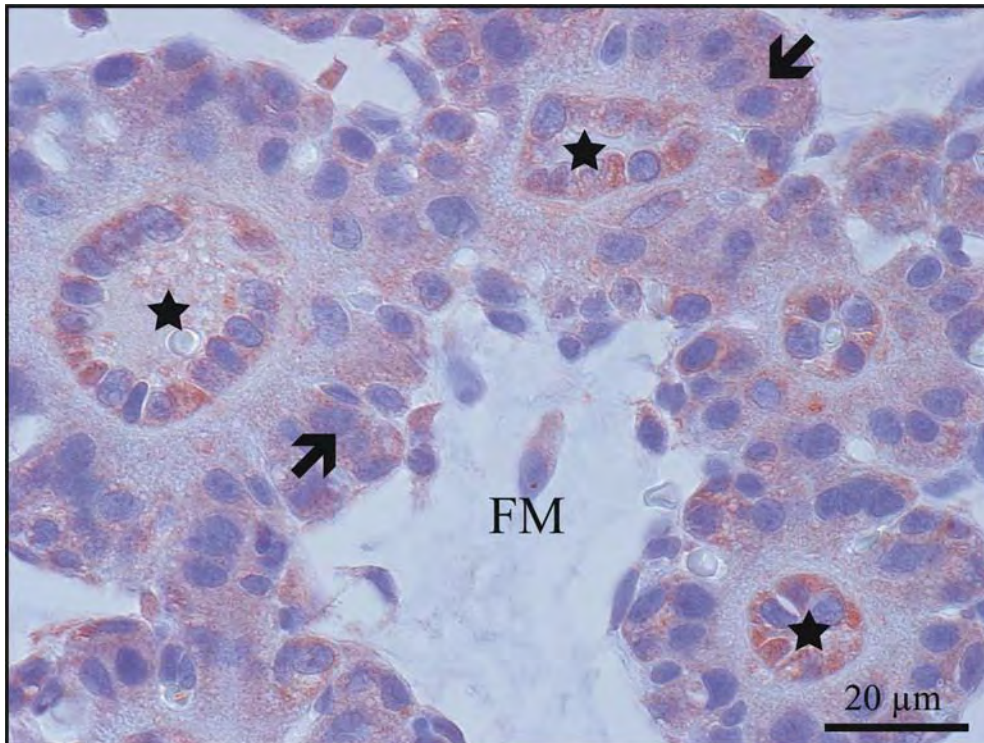


Abb. 24: Im Plazentalabyrinth des Hundes sind die Endothelien der maternalen Kapillaren (Sterne) intensiv für Flt-1 gefärbt. Die Endothelzellen des fetalen Mesenchyms (FM) sind ebenfalls positiv. Der Trophoblast (Pfeile) weist eine mäßige Immunreaktivität auf.

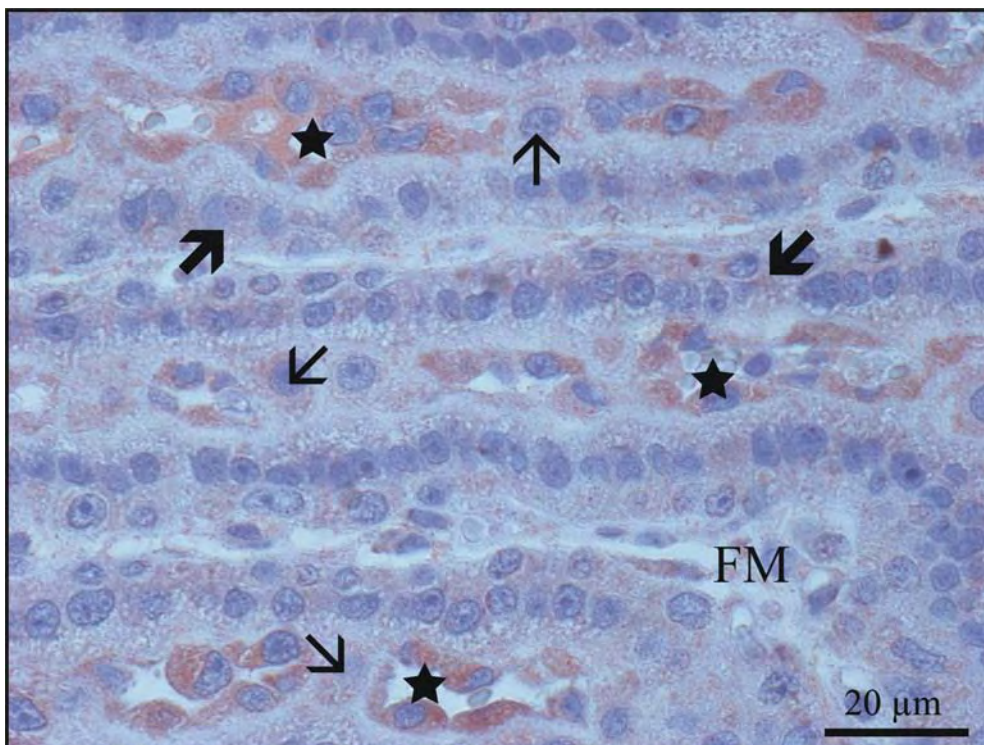


Abb. 25: Plazentalabyrinth der Katze. Die Endothelzellen der maternalen Kapillaren (Sterne) zeigen ein stark positives Signal für Flt-1. Ebenfalls sind die Kapillaren des fetalen Mesenchyms (FM) gefärbt. Im Trophoblast (dicke Pfeile) sowie in den Deziduazellen (dünne Pfeile) ist eine eher schwache bis mäßige Färbung zu finden.

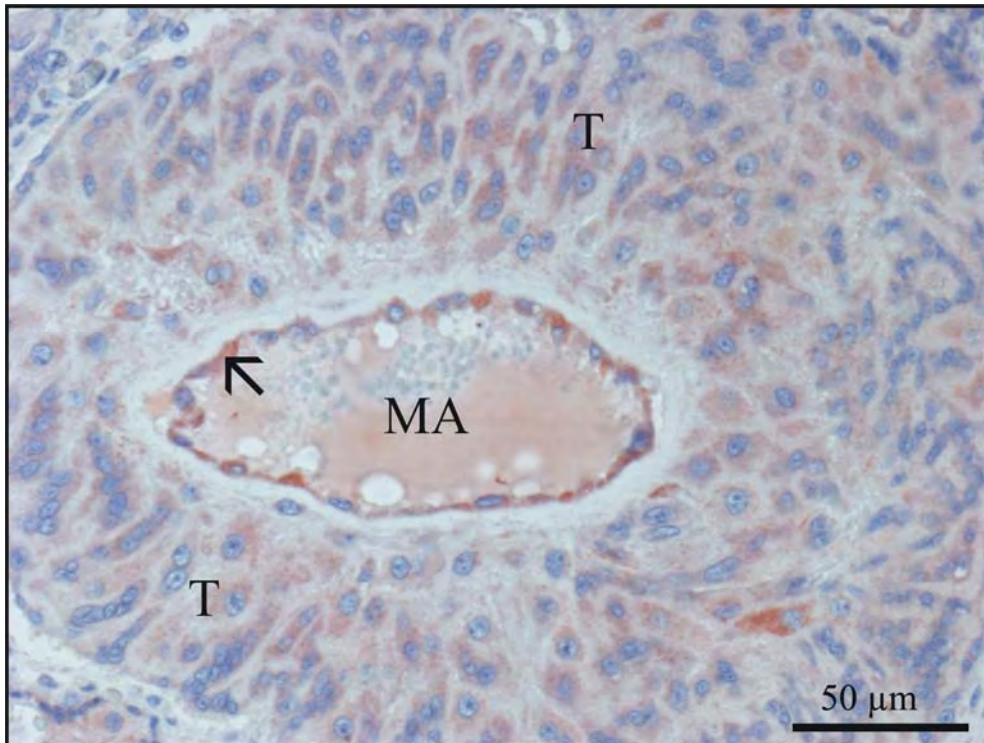


Abb.26: Invasionszone Hund. In der Invasionszone zeigt der invadierende Trophoblast (T) ein starkes, und die Endothelzellen (Pfeil) der maternalen Arterie (MA) ein sehr starkes Signal für Flt-1.

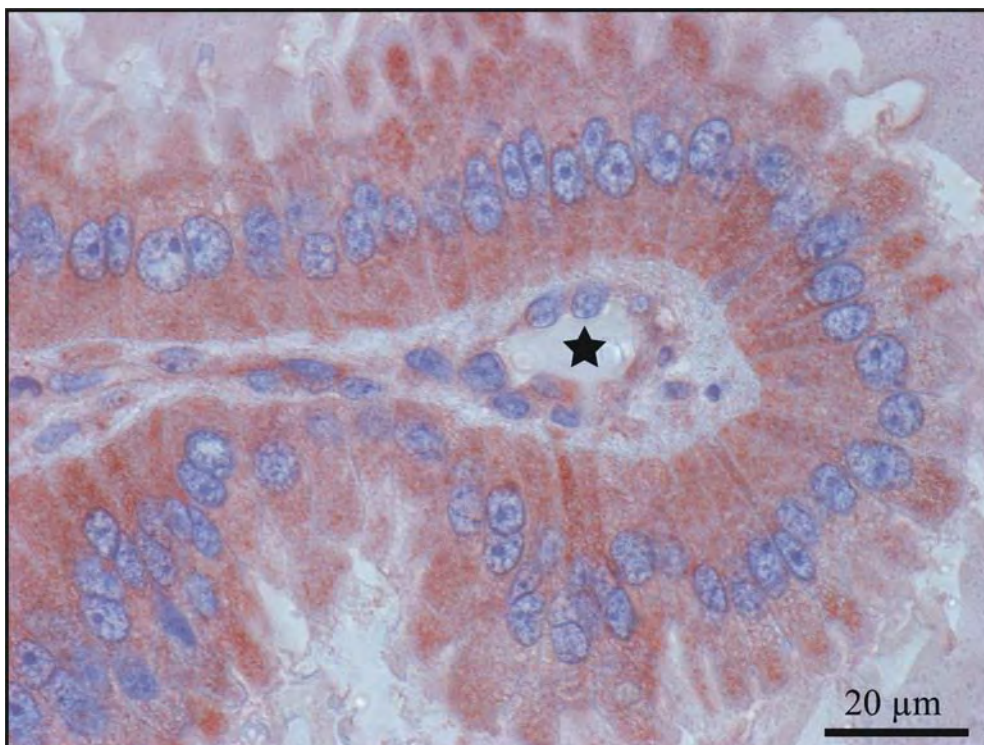


Abb. 27: Drüsenkammern des Hundes. Die Zylinderepithelzellen der Drüsenkammern sind stark positiv für Flt-1, und das Endothel der Kapillaren (Stern) ist ebenfalls gefärbt.

VEGFR-2/Flk-1/KDR

Wie bereits bei VEGF und Flt-1 wurde vorab die Spezifität des Antikörpers überprüft. Dazu wurde wiederum eine Vorinkubation mit einem Blockierungspeptid durchgeführt, welche die Spezifität des Flk-1-Antikörpers bestätigte.

Das Flk-1-Protein war während der gesamten Gravidität im Trophoblasten detektierbar. Dabei variierte die Stärke der Immunreaktion von Tier zu Tier. Teilweise war der Synzytiotrophoblast stärker positiv als der Zytotrophoblast. Die stärkste Immunreaktion wurde im invasiven Trophoblasten der Invasionszone detektiert. Bei fortschreitender Gravidität wurde die Immunreaktion im Trophoblasten eher stärker als zu Beginn der Trächtigkeit. Im Plazentalabyrinth waren die Endothelien der Gefäße bei einem Großteil der Tiere sehr schwach positiv, nur bei einigen wenigen war eine mäßige Farbreaktion festzustellen. Besonders beim Hund fiel aber auf, dass der Bereich direkt um die Gefäße herum stark positive Signale zeigte. In den großen maternalen Arterien der Invasionszone waren die Endothelien schwach bis mäßig gefärbt. Im Bereich der Drüsenkammern dagegen war in den Endothelien der maternalen Gefäße eine deutliche Immunreaktion festzustellen. Die Epithelien der Drüsenschicht und Kammern waren eigentlich über die gesamte Gravidität immer deutlich gefärbt, allerdings wurde bei der Katze innerhalb des zweiten Drittels der Trächtigkeit eine leichte Abnahme der Intensität beobachtet. Beim Hund zeigte die Drüsenschicht immer ein stärker positives Signal als die Drüsenkammern. Das Myometrium war in jedem Trächtigkeitsstadium merklich gefärbt. Bei der Katze waren die Deziduazellen zu Beginn der Gravidität wenn nur schwach gefärbt, im Verlauf der Gravidität nahm die Farbreaktion zu (Abbildungen 28 bis 31). Die Epithelien des Randhämatoms waren zu jeder Zeit der Gravidität stark positiv.

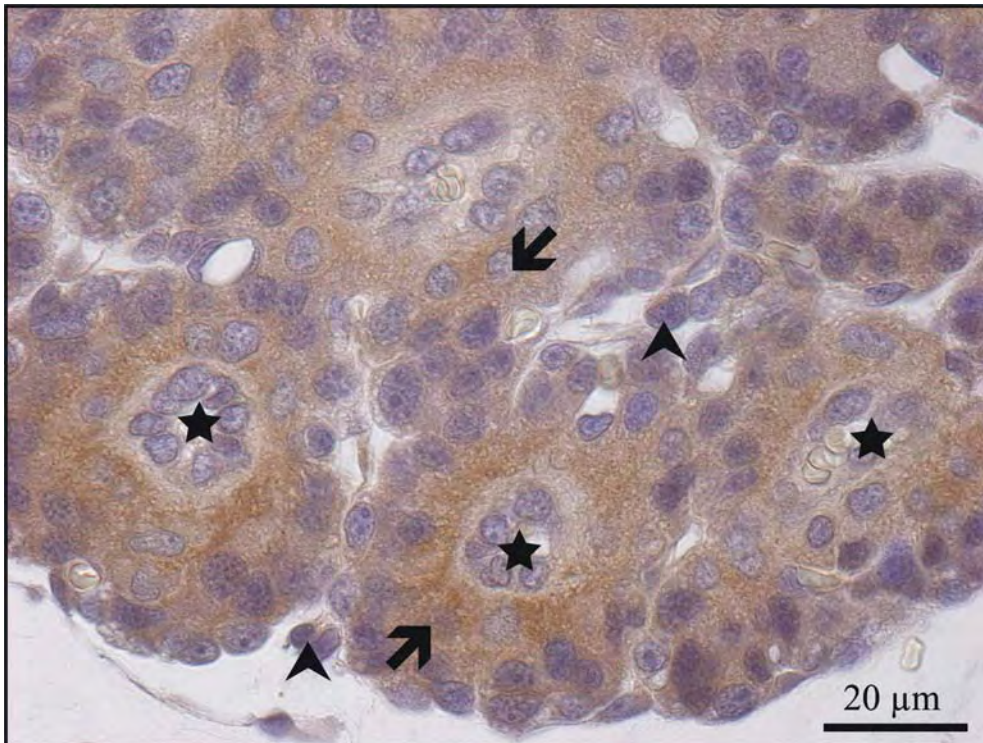


Abb. 28: Plazentalabyrinth Hund. KDR färbt den Trophoblasten (Pfeile) relativ stark an, aber das maternale Endothel (Sterne) zeigt nur schwach positive Signale. In den fetalen Kapillaren (Pfeilspitzen) ist eine leichte bis mäßige Färbung festzustellen.

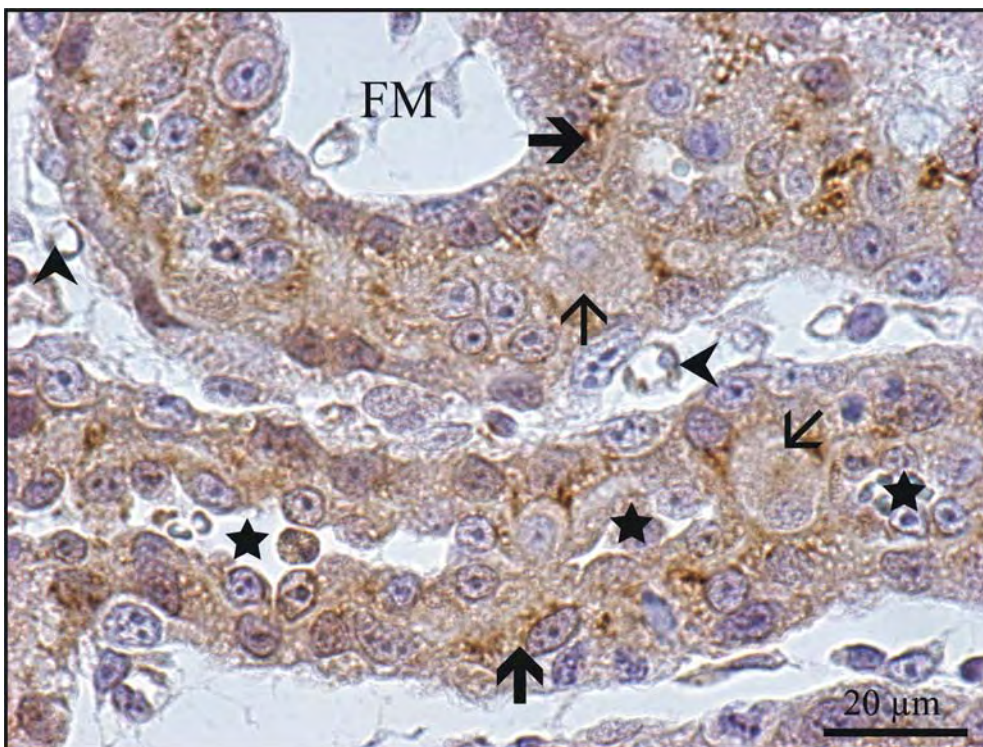


Abb. 29: Plazentalabyrinth der Katze. KDR färbt den Trophoblasten (dicke Pfeile) und detektiert etwas schwächere positive Signale in den Endothelzellen der maternalen (Sterne) und fetalen (Pfeilspitzen) Kapillaren. Auch die Deziduazellen (dünne Pfeile) sind schwach gefärbt.

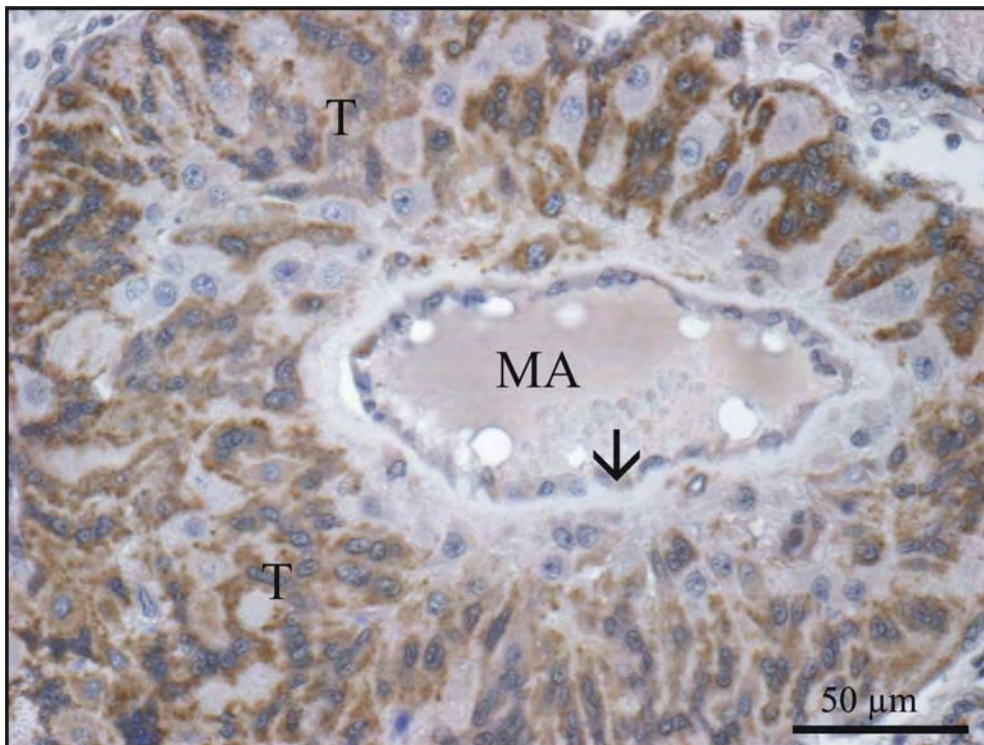


Abb.30: Invasionszone des Hundes. In der Invasionszone ist das Endothel (Pfeil) einer großen maternalen Arterie (MA) schwach positiv für KDR. Der invadierende Trophoblast (T) dagegen ist intensiv gefärbt.

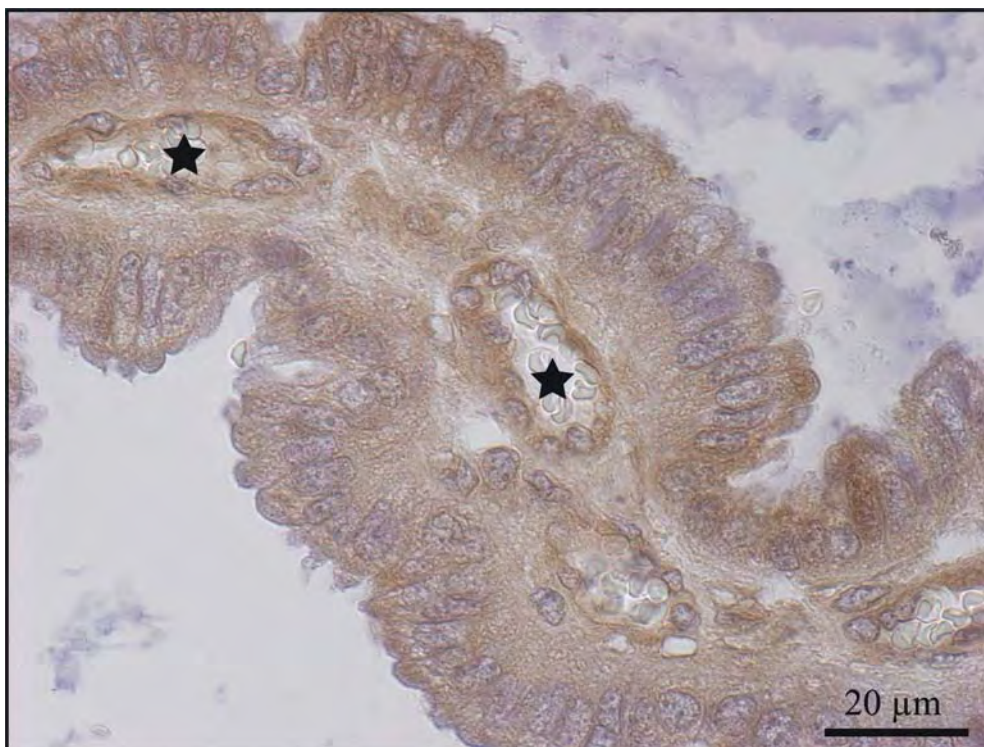


Abb. 31: Drüsenkammern des Hundes. Sowohl die Zylinderepithelzellen der Drüsenkammern als auch die Endothelzellen der Kapillaren (Sterne) zeigen eine Färbung für KDR.

3.2 Ergebnisse des Western Blots

VEGF

Der Nachweis des VEGF-Proteins am Plazentahomogenat von Hund und Katze erfolgte mit Hilfe der indirekten Methode über die Alkalische Phosphatase. Als Positivkontrolle wurde ein kommerziell erworbenes Gesamtzell-Lysat aus der Maus eingesetzt. Dabei war das VEGF-Protein in jedem untersuchten Trächtigkeitsstadium nachweisbar, sowohl im Plazentahomogenat des Hundes als auch in dem der Katze. Bei beiden Tierarten wurden das erste, zweite und dritte Trächtigkeitsdrittel auf das Vorhandensein des VEGF-Proteins überprüft. Die Abbildung 32 zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 27 kDa und 54 kDa, je nachdem ob das Protein als Monomer oder Dimer vorliegt.

Bei der Positivkontrolle war die Bande ebenfalls auf einer Höhe von 54 kDa, hier war lediglich das Dimer nachweisbar. Bei einer Vorinkubation des Antikörpers mit einem Blockierungspeptid waren keine Banden sichtbar, was die Spezifität des Antikörpers bestätigt.

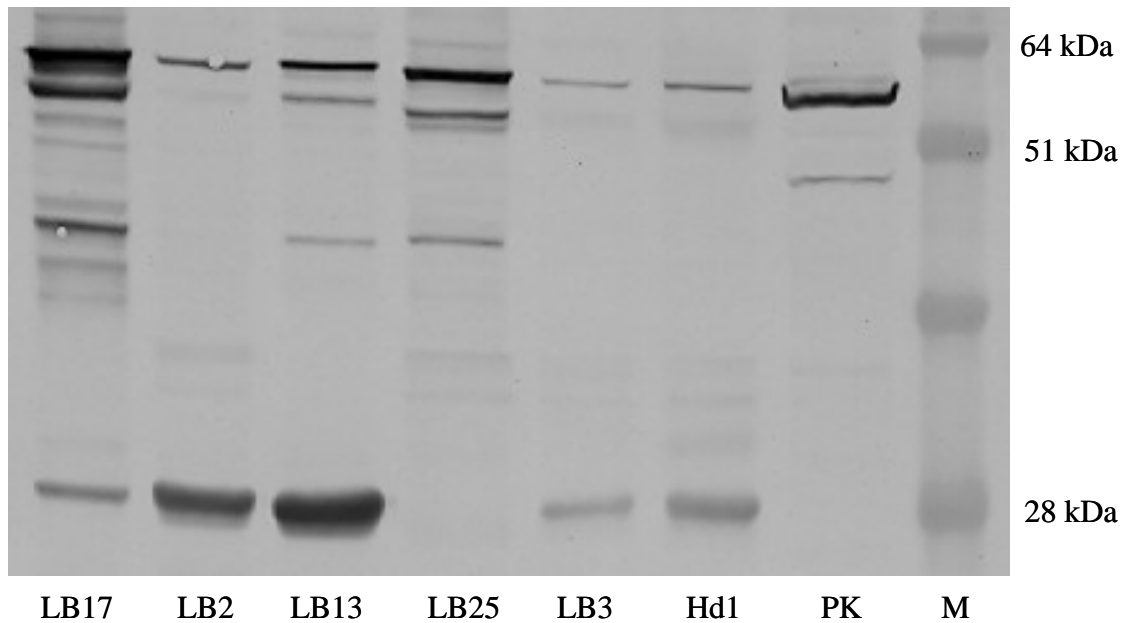


Abb. 32: Nachweis des VEGF-Proteins am Plazentahomogenat von Hund und Katze mittels WB. M: Marker, PK: Positivkontrolle, Hd1: Hund frühe Gravidität, LB3: Hund Graviditätsmitte, LB25: Hund späte Gravidität, LB13: Katze frühe Gravidität, LB2: Katze Graviditätsmitte, LB17: Katze späte Gravidität. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 27 kDa und 54 kDa.

VEGFR-1/Flt-1

Der Nachweis des Flt-1-Proteins am Plazentahomogenat von Hund und Katze erfolgte ebenfalls mit Hilfe der indirekten Methode über die Alkalische Phosphatase. Als Positivkontrolle diente hier ein kommerziell erworbenes Gesamtzell-Lysat aus der Ratte. Das Flt-1-Protein war sowohl im Plazentahomogenat des Hundes als auch im Plazentahomogenat der Katze nachweisbar. Die Abbildung 33 zeigt eine repräsentativen Western Blot. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 180 kDa, bei der Katze jedoch nur bei 148 kDa. Bei der Positivkontrolle war die Bande ebenfalls auf der erwarteten Höhe von 180 kDa nachzuweisen.

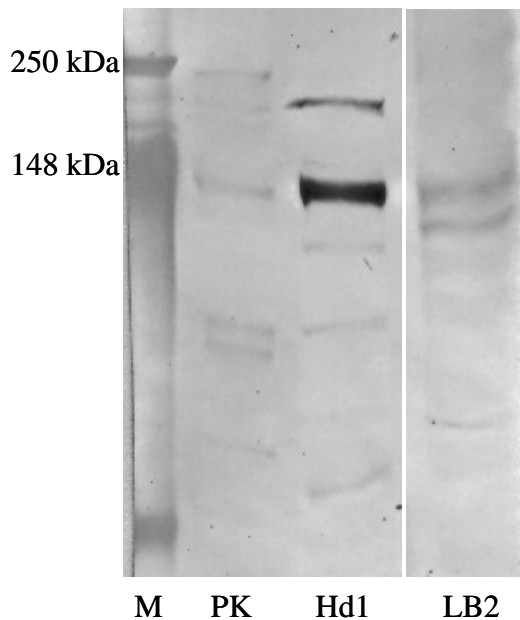


Abb. 33: Nachweis des Flt-1-Proteins am Plazentahomogenat von Hund und Katze mittels WB. M: Marker, PK: Positivkontrolle, Hd1: Hund, LB2: Katze. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 180 kDa, bei der Katze jedoch nur bei 148 kDa.

VEGFR-2/Flk-1/KDR

Das Flk-1-Protein wurde ebenfalls am Plazentahomogenat von Hund und Katze nachgewiesen und erfolgte wiederum mit Hilfe der indirekten Methode über die Alkalische Phosphatase. Ein kommerziell erworbener Mäuseleberextrakt wurde als Positivkontrolle verwendet. Auch das Flk-1-Protein war sowohl im Plazentahomogenat des Hundes als auch im Plazentahomogenat der Katze nachweisbar. Die Abbildung 34 stellt einen repräsentativen Western Blot dar. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 190 kDa. Bei der Positivkontrolle war die Bande auf einer Höhe von 170 kDa nachzuweisen.

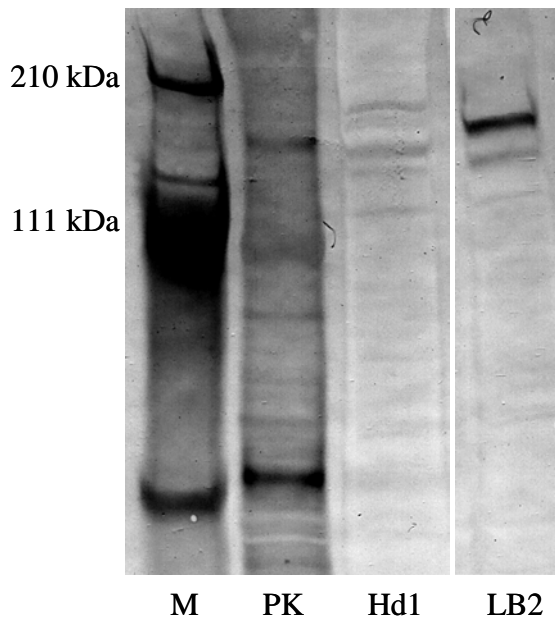


Abb. 34: Nachweis des Flk-1-Proteins am Plazentahomogenat von Hund und Katze mittels WB. M: Marker, PK: Positivkontrolle, Hd1: Hund, LB2: Katze. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 190 kDa.

3.3 Ergebnisse der RT-PCR

Spezifische mRNA von VEGF, Flt-1 und Flk-1 konnte mittels der RT-PCR in der endotheliochorialen Plazenta in den unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien nachgewiesen werden. Die RT-PCR wurde am Gesamthomogenat des Plazentagewebes jeweils von Hund und Katze eingesetzt. Von jeder Tierart wurde das erste (Hd 1, LB 13), zweite (LB 3, LB 2) und dritte Drittel (LB 25, LB 17) des Trächtigkeitsstadiums untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die jeweilige spezifische mRNA in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien exprimiert wurde.

VEGF konnte auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Stadien durch Amplifikate in der erwarteten Größe von 72 bp qualitativ nachgewiesen werden (Abbildung 35). Auch die mRNA der Rezeptoren Flt-1 und Flk-1 wurde während der gesamten Gravidität exprimiert. Die amplifizierte PCR-Produkte von Flt-1 zeigten sich mit einer erwarteten Größe von 81 bp (Abbildung 36), die von Flk-1 zeigten sich mit einer erwarteten Größe von 75 bp (Abbildung 37). Als Größenstandard wurde ein 50 bp DNA Marker aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Wasserleerprobe aufgetragen, die als Negativkontrolle diente; in dieser war keine cDNA nachweisbar. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anschließend durch Sequenzierung in

einem kommerziellen Labor (QIAGEN Genomic Services; QIAGEN GmbH, Hilden) bestätigt.

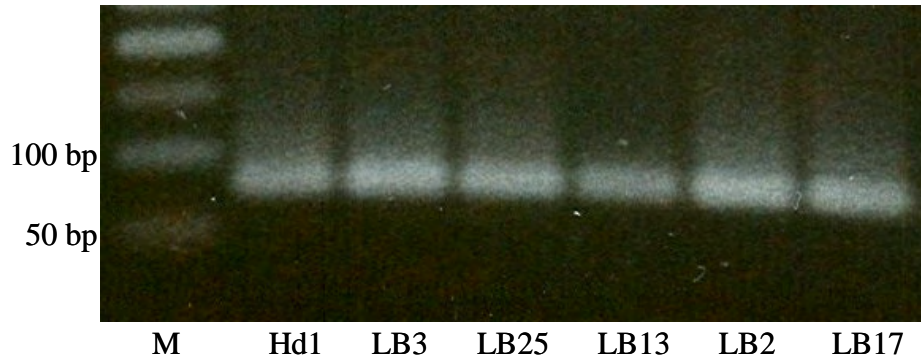


Abb.35: Nachweis der VEGF-mRNA am Plazentahomogenat von Hund (Hd 1, LB 3, LB 25) und Katze (LB 13, LB 2, LB 17) in verschiedenen Trächtigkeitsstadien. Die VEGF-mRNA wurde jeweils in allen drei untersuchten Stadien nachgewiesen. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 72 bp. M entspricht einem 50 bp Marker.

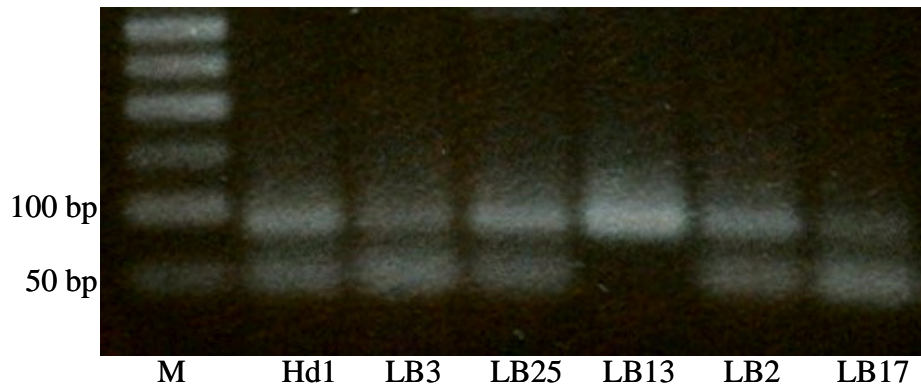


Abb.36: Nachweis der Flt-1-mRNA am Plazentahomogenat von Hund (Hd 1, LB 3, LB 25) und Katze (LB 13, LB 2, LB 17) in verschiedenen Trächtigkeitsstadien. Die Flt-1-mRNA wurde jeweils in allen drei untersuchten Stadien nachgewiesen. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 81 bp. M entspricht einem 50 bp Marker.

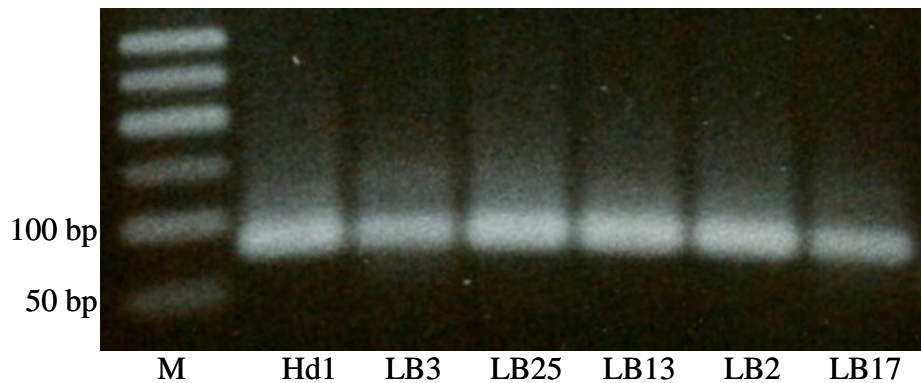


Abb.37: Nachweis der Flk-1-mRNA am Plazentahomogenat von Hund (Hd 1, LB 3, LB 25) und Katze (LB 13, LB 2, LB 17) in verschiedenen Trächtigkeitsstadien. Die Flk-1-mRNA wurde jeweils in allen drei untersuchten Stadien nachgewiesen. Die Banden liegen auf einer erwarteten Höhe von 75 bp. M entspricht einem 50 bp Marker.

3.4 Ergebnisse der Real Time RT-PCR

3.4.1 Ergebnisse der Real Time RT-PCR für den Hund

Zur Anwendung der semiquantitativen Real Time RT-PCR wurden die untersuchten Tiere in drei Gruppen unterteilt. Die Gruppen wurden in die frühe, mittlere und späte Gravidität eingeteilt, jede Gruppe enthielt drei Tiere. Die Tiere der dritten Gruppe, also der späten Gravidität, befanden sich alle im Stadium der Luteolyse.

VEGF

Nach Anwendung der 1-faktoriellen Varianz-Analyse zeigte sich kein signifikanter Zeiteffekt ($p=0,2041$). Die höchste VEGF mRNA-Expression wurde in der frühen Gravidität beobachtet, danach ergab sich ein stetiger Abfall bis zur Geburt. Dabei war der Unterschied zwischen den einzelnen Stadien wiederum nicht signifikant (Abbildung 38).

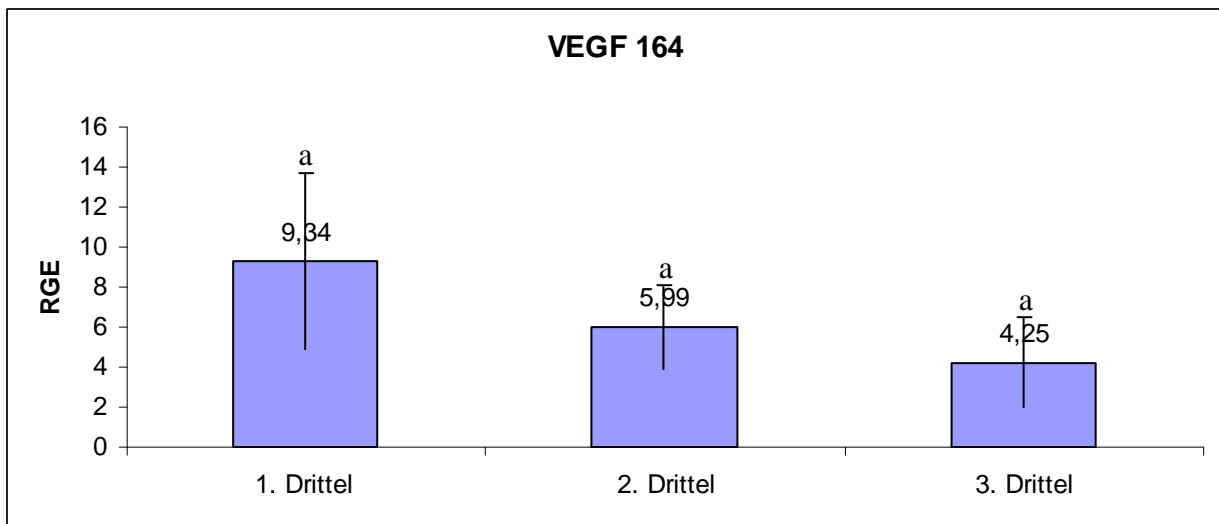


Abb. 38: Expression der VEGF-mRNA am Plazentahomogenat des Hundes mittels Real Time RT-PCR. Untersucht wurde das Expressionsniveau im ersten, zweiten und dritten Drittel der Gravidität. Es konnte kein signifikanter Zeiteffekt ($p=0,2041$) nachgewiesen werden. Auch der Unterschied zwischen den einzelnen Stadien war nicht signifikant. RGE = relative Gen-Expression.

VEGFR-1/Flt-1

Nach Anwendung der 1-faktoriellen Varianz-Analyse zeigte sich ein hoch-signifikanter Zeiteffekt ($p=0,0014$). Die höchste Expression der Flt-1 mRNA wurde in der späten Gravidität beobachtet. Dabei war der Anstieg von der frühen und mittleren Gravidität bis zum Zeitpunkt kurz vor der Geburt hoch signifikant ($p\leq 0,01$) (Abbildung 39).

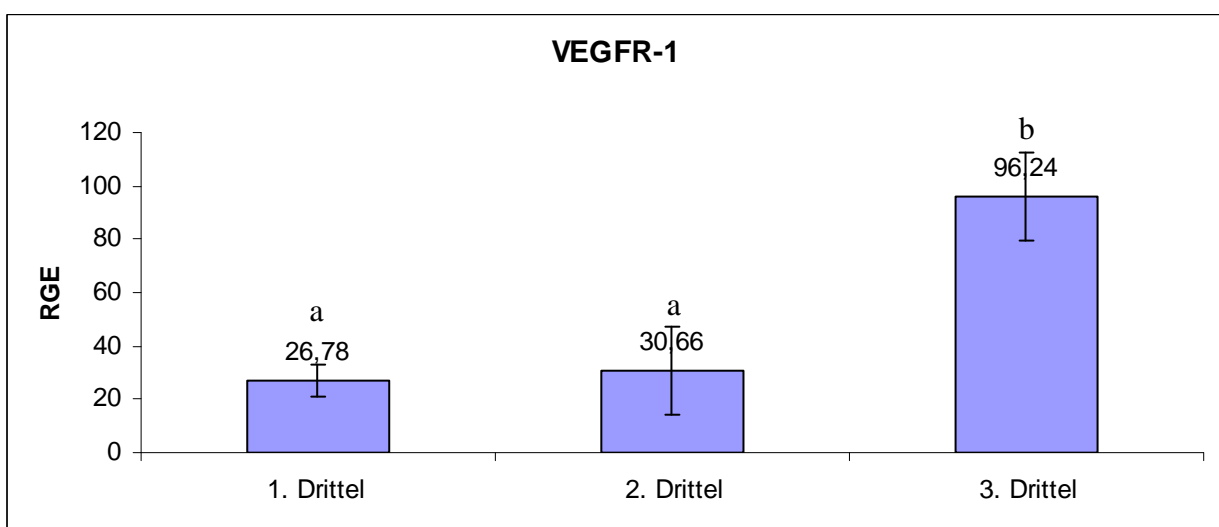


Abb. 39: Expression der Flt-1-mRNA am Plazentahomogenat des Hundes mittels Real Time RT-PCR. Untersucht wurde das Expressionsniveau im ersten, zweiten und dritten Drittel der Gravidität. Es zeigte sich ein hoch-signifikanter Zeiteffekt ($p=0,0014$). Säulen mit verschiedenen Markierungen (a,b) unterscheiden sich mit $p\leq 0,01$. RGE = relative Gen-Expression.

VEGFR-2/Flk-1/KDR

Nach Anwendung der 1-faktoriellen Varianz-Analyse zeigte sich ein signifikanter Zeiteffekt ($p=0,0103$). Die Flk-1 mRNA-Expression war in den Stadien der frühen Gravidität niedrig, hoch in der Gestationsmitte und zum Ende der Gravidität wieder niedrig. Dabei konnte ein signifikanter ($p\leq 0,05$) Unterschied zwischen dem mittleren Gestationsstadium im Vergleich zu dem frühen und späten Stadium der Gravidität nachgewiesen werden (Abbildung 40).

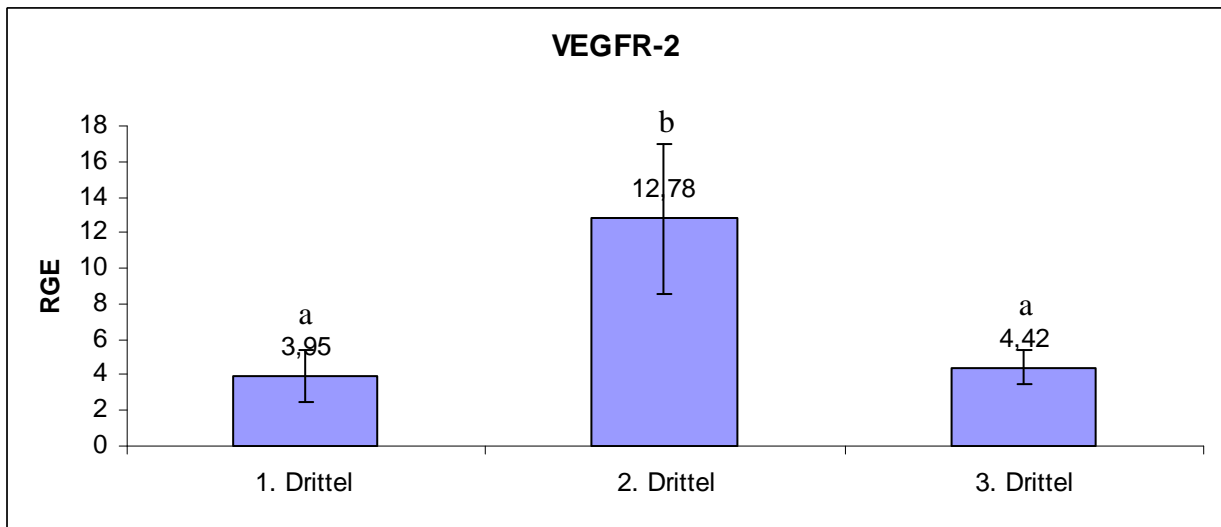


Abb. 40: Expression der Flk-1-mRNA am Plazentahomogenat des Hundes mittels Real Time RT-PCR. Untersucht wurde das Expressionsniveau im ersten, zweiten und dritten Drittel der Gravidität. Es zeigte sich ein signifikanter Zeiteffekt ($p=0,0103$). Säulen mit verschiedenen Markierungen (a,b) unterscheiden sich mit $p\leq 0,05$. RGE = relative gene expression.

3.4.2 Ergebnisse der Real Time RT-PCR für die Katze

Zur Anwendung der semiquantitativen Real Time RT-PCR wurden die untersuchten Katzen, wie schon die Hunde, in drei Gruppen unterteilt. Die Gruppen wurden ebenfalls in die frühe, mittlere und späte Gravidität eingeteilt, jede Gruppe enthielt drei Tiere.

Bei der Katze ergaben sich aber zwischen den einzelnen Tieren innerhalb einer Gruppe teilweise erhebliche Unterschiede in der relativen Expression, so dass keine Diagramme erstellt wurden und eine Auswertung über statistische Verfahren nicht durchgeführt wurde. Die ungleichen Werte innerhalb einer Gruppe wurden trotz mehrfach wiederholtem Versuchsansatz beobachtet. Aus diesem Grund werden die Expressionsmuster der Werte der Katze hier tabellarisch dargestellt.

Tabelle 26: Ergebnisse der Real Time RT-PCR für die Katze

	VEGF 164			GAPDH							
	Wert	MWert	SD	Wert	MWert	SD	dCt	dCt- Kal	ddCt	MWert	SD
LB19	29,33	28,68	0,92	37,18	36,415	1,08	-7,74	0,01	1,00	28,70	47,52
	28,03			35,65							
LB20	23,83	23,75	0,11	31,8	32,115	0,45	-8,37	-0,63	1,45		
	23,67			32,43							
LB13	19,31	19,685	0,53	33,57	33,81	0,34	-14,13	-6,39	83,58		
	20,06			34,05							
LB28	21,29	21,475	0,26	30,99	31,265	0,39	-9,79	-2,05	4,14	7,62	4,55
	21,66			31,54							
LB2	21,07	21,15	0,11	32,10	31,465	0,90	-10,32	-2,58	5,96		
	21,23			30,83							
LB16	20,16	19,86	0,42	31,08	31,275	0,28	-11,42	-3,68	12,77		
	19,56			31,47							
LB10	25,59	25,535	0,08	34,47	33,92	0,78	-8,39	-0,65	1,56	10,34	8,61
	25,48			33,37							
LB14	22,69	22,85	0,23	33,00	34,01	1,43	-11,16	-3,42	10,70		
	23,01			35,02							
LB17	24,78	24,82	0,06	36,81	36,79	0,03	-11,97	-4,23	18,77		
	24,86			36,77							
	VEGF R-1			GAPDH							
	Wert	MWert	SD	Wert	MWert	SD	dCt	DCt- Kal	ddCt	MWert	SD
LB19	33,93	34,05	0,17	37,18	36,415	1,08	-2,37	0,00	1,00	5,95	8,42
	34,17			35,65							
LB20	29,50	29,51	0,01	31,80	32,115	0,45	-2,61	-0,24	1,18		
	29,52			32,43							
LB13	27,44	27,47	0,04	33,57	33,81	0,34	-6,34	-3,97	15,67		
	27,50			34,05							
LB28	31,36	31,25	0,16	31,27	31,595	0,46	-0,34	2,03	0,25	2,41	1,93
	31,14			31,92							

LB2	27,54	27,51	0,04	32,10	31,465	0,90	-3,96	-1,59	3,00		
	27,48			30,83							
LB16	26,52	26,915	0,56	31,08	31,275	0,28	-4,63	-1,99	3,97		
	27,31			31,47							
LB10	29,00	29,425	0,60	34,47	33,92	0,78	-4,50	-2,13	4,36	4,00	0,19
	29,85			33,37							
LB14	29,66	29,595	0,09	33,00	34,01	1,43	-4,42	-2,05	4,13		
	29,53			35,02							
LB17	32,47	32,195	0,39	36,26	36,515	0,36	-4,32	-1,95	3,86		
	31,92			36,77							
	VEGF R-2			GAPDH							
	Wert	MWert	SD	Wert	MWert	SD	dCt	DCt- Kal	ddCt	MWert	SD
LB19		37,50		33,89	32,95	1,33	4,55	-4,17	18,00	87,24	63,11
	37,50			32,01							
LB20	30,48	30,45	0,04	28,74	28,875	0,19	1,58	-7,17	141,53		
	30,42			29,01							
LB13	31,72	32,06	0,48	29,55	30,015	0,66	2,05	-6,68	102,18		
	32,40			30,48							
LB28	31,89	31,415	0,67	30,90	30,285	0,87	1,13	-7,59	192,67	574,92	527,1
	30,94			29,67							
LB2	30,35	30,24	0,16	32,12	31,72	0,57	-1,48	-10,20	1176,3		
	30,13			31,32							
LB16	31,73	31,52	0,30	31,08	31,275	0,28	0,25	-8,48	355,82		
	31,31			31,47							
LB10	39,01	39,035	0,04	30,61	30,34	0,38	8,70	-0,03	1,02	17,86	18,03
	39,06			30,07							
LB14	34,93	34,72	0,30	30,38	31,205	1,17	3,52	-5,21	36,89		
	34,51			32,03							
LB17	38,31	37,785	0,74	33,28	33,035	0,35	4,75	-3,97	15,67		
	37,26			32,79							

Zu beachten sind die fett gedruckten Werte, welche die relative Expression sowie die errechneten Mittelwerte der relativen Expression innerhalb einer Gruppe darstellen.

3.5 Ergebnisse der In Situ Hybridisierung

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen des VEGF-Proteins wurden mittels ISH auf mRNA-Ebene bestätigt.

VEGF

Die Lokalisation der mRNA von VEGF direkt in den Gewebeschnitten erfolgte mit der in situ Hybridisierung. Die hierzu hergestellten Ribosonden wurden zunächst in einem Vorversuch auf ihre Eigenschaft zur Hybridbildung mit der mRNA von VEGF im Gewebe getestet. Eine braune Farbreaktion im Zytoplasma der Zellen zeigte, dass die mit Not I/T7 hergestellte Ribosonde ein Ribonukleotid-Hybrid bilden konnte („Antisense-Sonde“). Diese Reaktion bestätigte den positiven Nachweis der mRNA von VEGF aus der RT-PCR. Dagegen trat bei den Schnitten, die mit der Ribosonde aus der Reaktion mit Nco I/SP6 behandelt wurden, keine Farbreaktion auf. Diese komplementäre Ribosonde war identisch zu der im Gewebe vorhandenen mRNA und konnte somit nicht hybridisieren (Abbildung 41). In den weiteren Versuchen wurde diese Sonde somit als Negativkontrolle („Sense-Sonde“) eingesetzt.

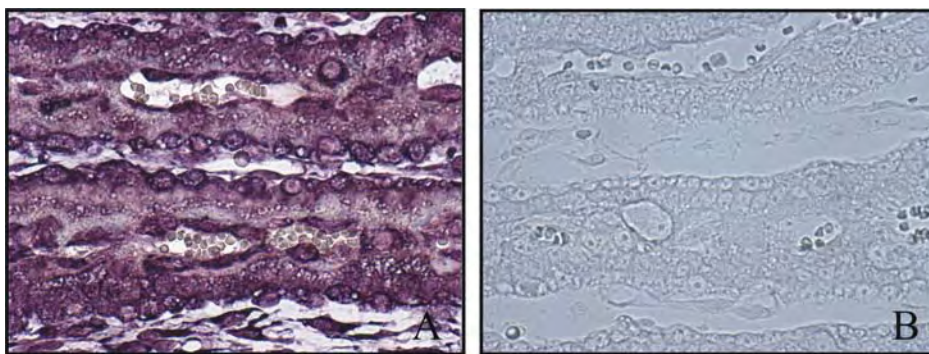


Abb.41: Identifizierung der Sonden als Antisense- (Fähigkeit zur Hybridisierung mit der im Gewebe befindlichen mRNA) und Sense-Sonden. Die Antisense-Sonde ergibt eine braunschwarze Färbung (A), während die mit der Sense-Sonde behandelten Schnitte komplett ungefärbt blieben (B).

Die mRNA von VEGF wurde in den Endothelien der fetalen und maternalen Gefäße im gesamten Verlauf der Gravidität stark exprimiert. Im Bereich des Chorions war diese Farbreaktion teilweise etwas stärker als im restlichen Gewebe. Auch der Trophoblast war in allen Stadien der Trächtigkeit deutlich gefärbt, hier zeigte der Zytotrophoblast bei einigen Tieren eine stärkere Farbreaktion als der Synzytiotrophoblast. Die tiefe Drüsenschicht und die Drüsenkammern wiesen in jedem untersuchten Stadium ein deutlich positives Signal auf. Bei

der Katze waren die Deziduazellen zu jedem Zeitpunkt stark gefärbt, nur bei einzelnen Tieren war eine schwächere Farbreaktion zu beobachten (Abbildungen 42 bis 45). Das Myometrium war in allen Stadien leicht bis mäßig gefärbt und in den Epithelien des Randhämatoms war grundsätzlich ein stark positives Signal zu finden.

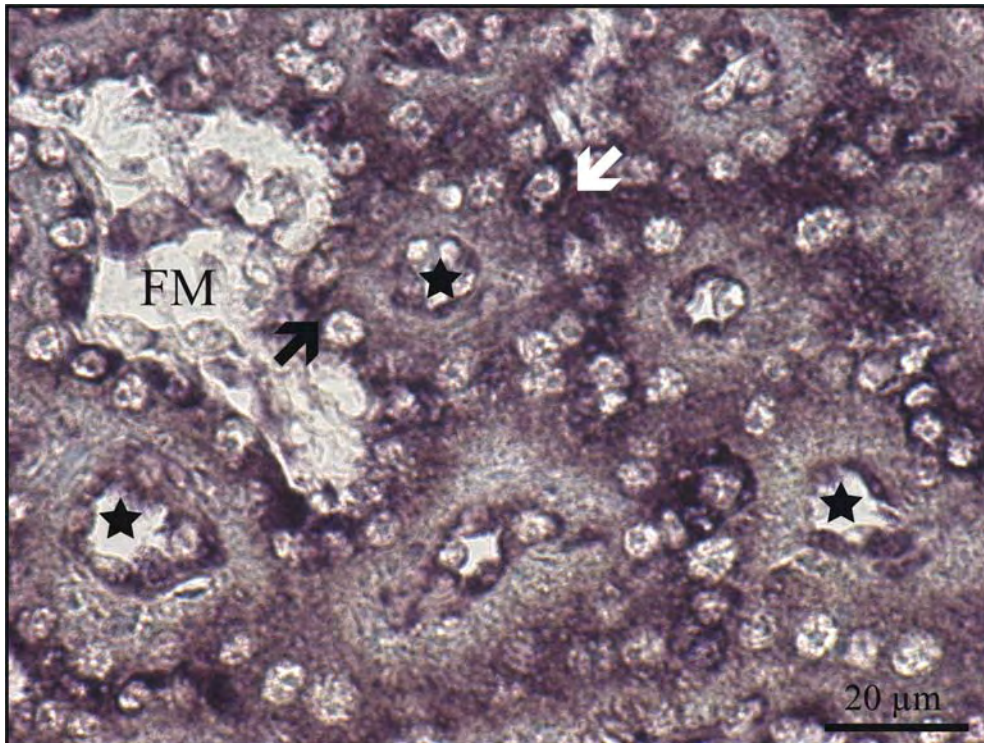


Abb.42: Plazentalabyrinth des Hundes. VEGF-mRNA wird im Trophoblasten (Pfeile) und dem Endothel der maternalen Kapillaren (Sterne) exprimiert. Zudem ist die mRNA in fetalen Mesenchymzellen (FM) lokalisiert.

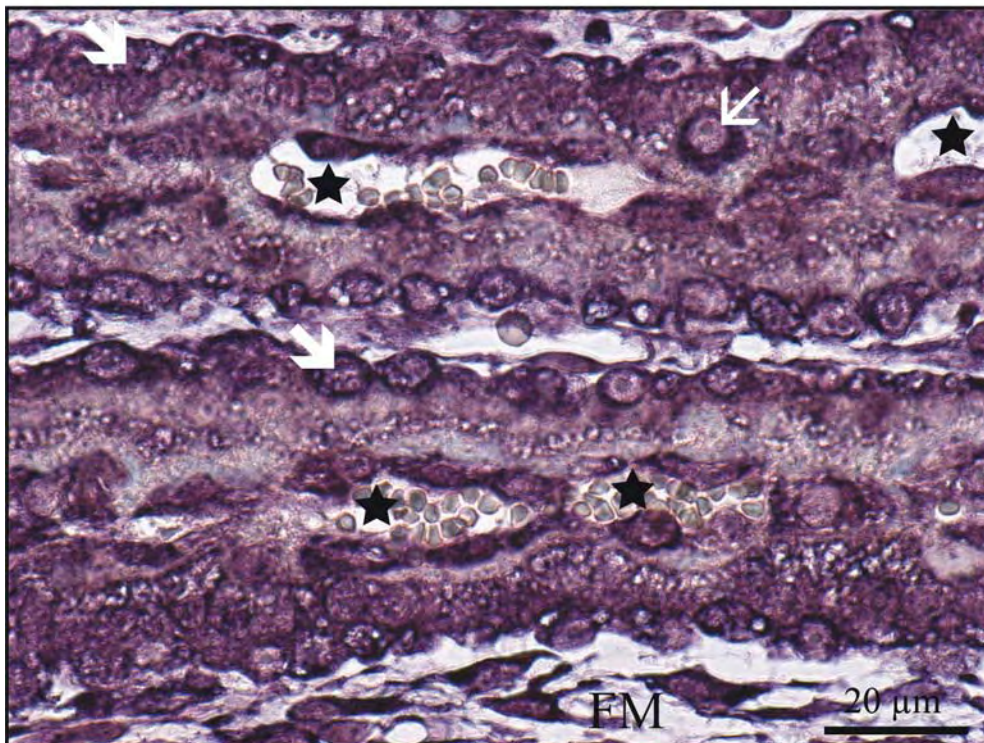


Abb.43: Plazentalabyrinth der Katze. Sowohl die maternalen Kapillaren (Sterne) als auch die fetalen Kapillaren des Mesenchyms (FM) exprimieren die VEGF-mRNA. Auch im Trophoblast (dicke Pfeile) und in den Deziduazellen (dünner Pfeil) tritt eine deutlich positive Hybridisierungsreaktion auf.

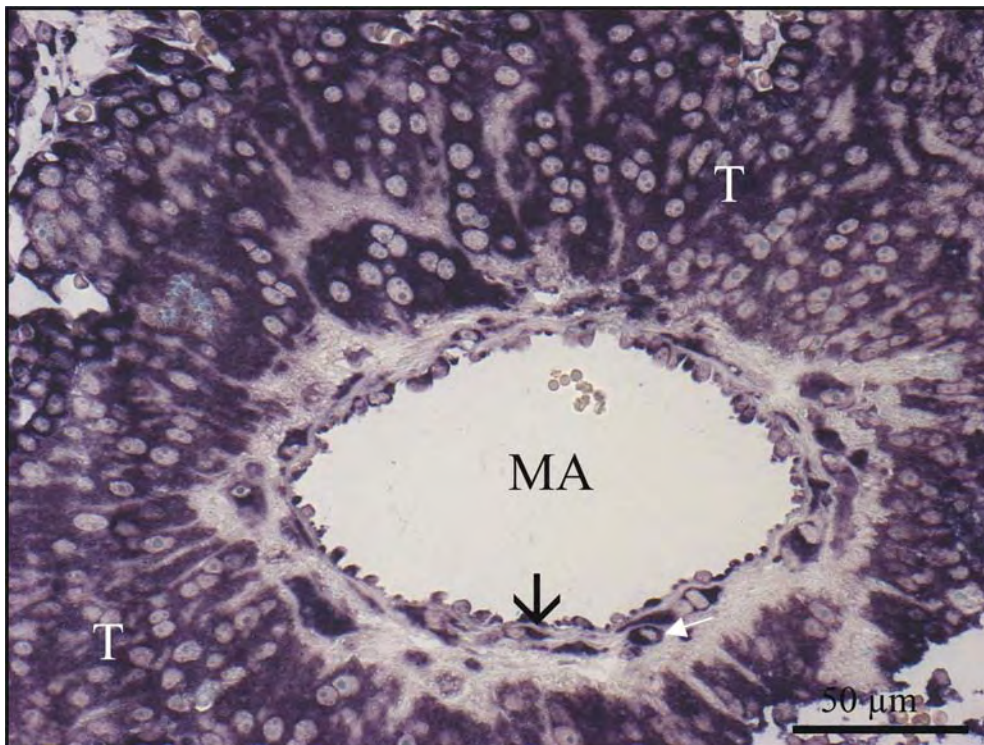


Abb. 44: Invasionszone des Hundes. In Gebieten mit fortschreitender Invasion zeigt der Trophoblast (T), welcher eine große maternale Arterie (MA) invadiert, eine deutlich positive Hybridisierungsreaktion. Die Endothelzellen (großer Pfeil) des maternalen Gefäßes exprimieren ebenfalls die VEGF-mRNA, und auch die letzten noch vorhandenen glatten Muskelzellen der Gefäßwand (kleiner Pfeil) sind positiv.

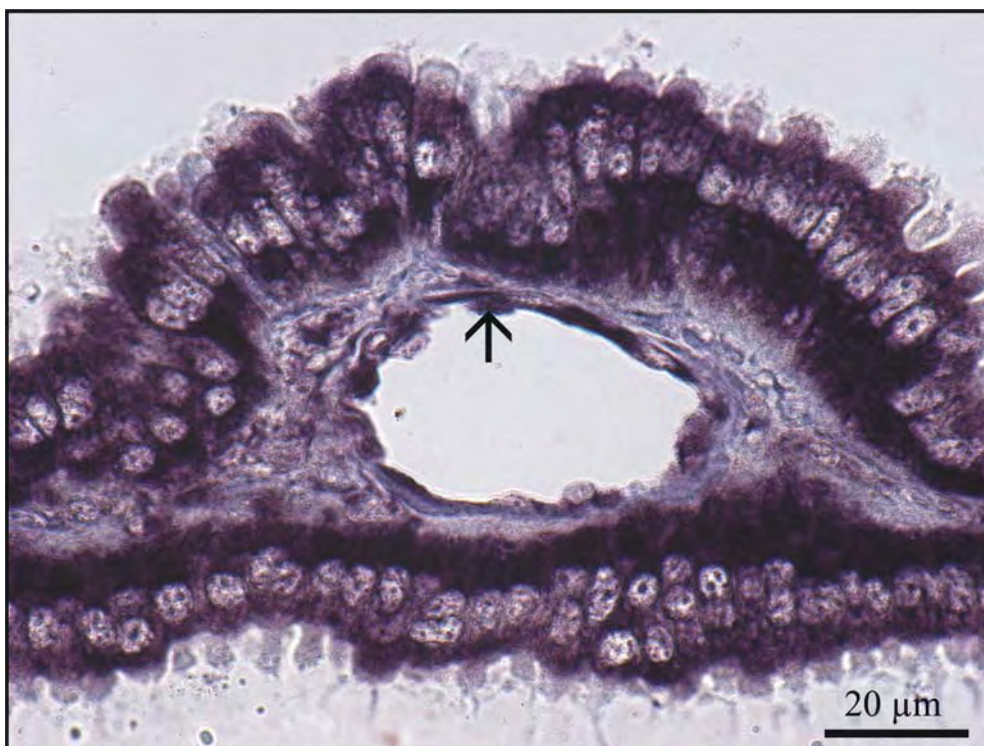


Abb. 45: Drüsenkammern des Hundes. Die Zylinderepithelzellen der Drüsenkammern des Hundes zeigen eine deutliche VEGF-mRNA-Expression und auch die Endothelien (Pfeil) der maternalen Kapillaren sind eindeutig positiv.

4 Diskussion

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) und seinen Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und KDR (VEGFR-2, Flk-1) in der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze nachzuweisen. Dies geschah sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene. Zuvor wurde eine immunhistochemische Identifikation der unterschiedlichen Zellpopulationen und der Invasionsstadien mit Markern für zytoskeletale Filamente durchgeführt. Eingesetzte Antikörper gegen die Zytoskelettfilamente waren α -smooth muscle Actin, Vimentin und Zytokeratin.

Die vorliegende Arbeit sollte über die Vaskularisierung, VEGF-Expression und dessen Rolle in der plazentaren Angiogenese der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze Aufschluss geben. Von besonderem Interesse waren weiterhin das Invasionsverhalten der Trophoblastzellen und die Charakterisierung der Deziduazellen.

4.1 Kritische Betrachtung der Methoden

Der Nachweis von VEGF und seinen Rezeptoren erfolgte sowohl auf qualitativer (Immunhistochemie, Western Blot, RT-PCR und In situ Hybridisierung) als auch auf quantitativer Ebene (Real Time RT-PCR).

Die untersuchten Plazenten von Hund und Katze entstammten aus Uteri unterschiedlicher Trächtigkeitsstadien. Die Einteilung der Stadien erfolgte in das erste, zweite und dritte Trächtigkeitsdrittel. Somit erlaubte das Untersuchungsmaterial eine Aussage über die Verhältnisse in der caninen und felines Plazenta während der gesamten Trächtigkeit, vom Beginn der Plazentaentwicklung bis zu dem Zeitpunkt kurz vor der Geburt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Einteilung der Plazenten in ein jeweiliges Trächtigkeitsstadium nur anhand von qualitativen Kriterien erfolgte. Dieses war in der Tatsache begründet, dass nur ein kleiner Teil des Kollektivs aus Trächtigkeiten mit bekanntem Decktermin stammte und der größte Teil im Rahmen von Tierschutzaktionen gewonnen wurde. Somit erfolgte die Einteilung zum Einen anhand der Entwicklung der Feten und zum Zweiten anhand einer histologischen Bewertung des Plazentationsstadiums am Paraffinschnitt.

Immunhistochemie (IHC)

Bei der IHC wurden für die verschiedenen Primärantikörper unterschiedliche Protokolle eingesetzt. Bei den drei Antikörpern gegen die Zytoskelettfilamente (α -smooth muscle Actin, Vimentin und Zytokeratin) wurde die ABC-Methode angewendet. Für VEGF kamen drei unterschiedliche Protokolle zum Einsatz. Dies waren die ABC-Methode, die APAAP-Methode und die Methode mit dem ImmPRESS™ Detection System. Sie erzielten dieselben Ergebnisse. Die beiden Rezeptoren wurden mit zwei verschiedenen Protokollen dargestellt. Für VEGFR-1 wurde die ABC-Methode verwendet, für VEGFR-2 die Methode mit dem ImmPRESS™ Detection System, da dieses für VEGFR-2 deutlichere Signal lieferte als die ABC- oder APAAP-Methode. Die Spezifität der Antikörper gegen VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 wurde durch eine Präinkubation des jeweiligen Antikörpers mit einem spezifischen Blockierungspeptid überprüft. Zudem wurde eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers ausgeschlossen, da in jedem Versuch auch eine Gewebeeinkubation mit normalem Pferdeserum in der Abwesenheit eines Primärantikörpers erfolgte, in welcher grundsätzlich keine Immunreaktivität auftrat. Diese negativen Ergebnisse bestätigten die Spezifität der Immunreaktion. Die IHC ermöglichte nur die qualitative Beurteilung der Expression, eine Quantifizierung ist mit dieser Methode nicht möglich.

Von der Katze liegt bisher lediglich eine Proteinsequenz von VEGF in der NCBI-Datenbank vor (NP_001009854), diese stimmt mit der VEGF-Proteinsequenz des Hundes aus der NCBI-Datenbank (AAD29682) zu 98 % überein. Da in der NCBI-Datenbank noch keine Proteinsequenzen für VEGFR-1 oder VEGFR-2 angegeben sind, wurden aufgrund der hohen Übereinstimmung der VEGF-Proteinsequenz nicht nur für diesen, sondern auch für die beiden Rezeptoren, bei Hund und Katze dieselben Primärantikörper eingesetzt. Zudem ist bekannt, dass bei allen bei Säugetierspezies bekannten VEGFs dieselbe Deletion vorkommt, und zwar das Fehlen eines einzelnen Glutaminsäurerests, der an Position 5 im humanen Protein anwesend ist. Dabei ist keiner der Unterschiede an einer Position lokalisiert, die relevant für die biologische Aktivität von VEGF ist (Christinger et al. 1996; Muller et al. 1997; Wiesmann et al. 1997; Scheidegger et al. 1999). Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass die caninen VEGF Rezeptoren den humanen Rezeptoren sehr ähneln. Die Struktur des caninen VEGFR-2 entspricht der des korrespondierenden humanen Rezeptors (Scheidegger et al. 1999). Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit für Hund und Katze die gleichen Antikörper eingesetzt, und bei beiden Tierarten erzeugten die verwendeten Antikörper spezifische Immunreaktionen in den erwarteten Zellpopulationen.

Western Blot (WB)

Für den WB wurde das Protein aus Plazentagewebestücken isoliert, die alle Anteile der endotheliochorialen Plazenta enthielten. Es wurde dementsprechend eine rein qualitative Aussage über die An- oder Abwesenheit von VEGF und seinen Rezeptoren in der Gesamtplazenta getroffen. Die Differenzierung, ob und in welchen maternalen oder fetalen Komponenten das Protein exprimiert wird, erfolgte über die Immunhistochemie.

VEGF wurde in allen untersuchten Stadien der Trächtigkeit vom caninen und felines Plazentagewebe exprimiert. Die Banden lagen auf einer erwarteten Höhe von 27 kDa und 54 kDa, je nachdem ob das Protein als Monomer oder Dimer vorlag (Ergun et al. 1997; Hansen-Algenstaedt et al. 2003; Celik-Ozenci et al. 2004; Demir et al. 2004). Bei der Positivkontrolle lag die Bande ebenfalls auf einer Höhe von 54 kDa, hier war lediglich das Dimer nachweisbar. Die Tatsache, dass bei einem der untersuchten Tiere (LB25) und bei der Positivkontrolle nur das VEGF-Dimer nachweisbar war, könnte seine Ursache darin haben, dass das verwendete Reducing Agent (NuPage® Sample Reducing Agent (10x), Invitrogen) DTT enthält. DTT hat aber eigentlich nur eine Halbwertszeit von einem halben Tag, so dass es gut möglich ist, dass trotz reduzierter Bedingungen vor allem VEGF-Dimere vorliegen und nicht in jeder Probe auch das Monomer nachzuweisen war.

Für VEGFR-1 und VEGFR-2 wurde exemplarisch jeweils das Plazentahomogenat eines Hundes und einer Katze untersucht. In beiden Geweben wurde die Expression von Flt-1 und KDR durch das Auftauchen von Banden auf spezifischer Höhe dargestellt. Für Flt-1 lagen die Banden auf einer erwarteten Höhe von 180 kDa, bei der Katze jedoch nur bei 148 kDa. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass bei der Katze nur das unreife Flt-1 nachweisbar war, dessen Größe bei circa 150 kDa liegt. Die beim Hund und in der Positivkontrolle nachgewiesenen Banden auf einer Höhe von 180 kDa entsprechen der Größe des reifen, glykosilierten Proteins. Die Banden von KDR lagen auf einer erwarteten Höhe von 190 kDa, sowohl im Plazentahomogenat des Hundes als auch in dem der Katze, so dass hier bei beiden Tierarten das reife, glykosilierte Protein nachgewiesen werden konnte. Laut der Literatur sind beide Rezeptoren glykosiliert; aber im Fall von KDR ist nur die finale glykosilierte Form fähig, als Antwort auf VEGF eine Autophosphorylierung durchzumachen (Takahashi und Shibuya 1997), wohingegen bei Flt-1 eine Rezeptor-Glykosilierung nicht essentiell für die hochaffine Bindung von VEGF ist (Barleon et al. 1997). Dementsprechend ist das bei der Katze gefundene unreife, nicht glykosilierte Flt-1 vermutlich genauso reaktionsfähig wie das reife, glykosilierte Protein des Hundes. Und bei KDR, wo eine Glykosilierung Voraussetzung

für die Reaktionsfähigkeit ist, liegt das gefundene Proteine auch bei beiden Tierarten in glykosilierter Form vor.

RT-PCR und Real Time RT-PCR

Die Durchführung beider Methoden ermöglichte hinsichtlich der Expression der VEGF-, Flt-1- und KDR-mRNA sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage. Die mRNA-Isolierung erfolgte aus Plazentagewebestücken, die alle Anteile der endotheliochorialen Plazenta enthielten. Dementsprechend beziehen sich die Ergebnisse der RT-PCR und der Real Time RT-PCR auf die Expression der entsprechenden mRNA in der Gesamtplazenta; eine differenzierte Aussage über die Expression der VEGF-mRNA in fetalen oder maternalen Komponenten der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze wurde mittels In situ Hybridisierung getroffen.

Die Primersequenzen für die Amplifikation von VEGF, Flt-1 und KDR wurden aus den bekannten hundespezifischen Sequenzen in der Gendatenbank entnommen. Dies waren für VEGF AF133248, für Flt-1 AF262963 und für KDR NM_001048024.

Eine qualitative Bewertung der Expression von VEGF, Flt-1 und KDR erfolgte durch den Einsatz der RT-PCR. Sowohl für den Hund als auch für die Katze wurde die Expression der jeweiligen mRNA in jedem der drei eingeteilten Trächtigkeitsstadien nachgewiesen.

Um einen Verlauf der Expression der untersuchten Gene im Verlauf der Trächtigkeit nachzuweisen, wurde im Folgenden eine Real Time RT-PCR mit dem TaqMan-Sonden Verfahren eingesetzt, da sich diese Methode im Vergleich zu anderen Real Time Methoden wie zum Beispiel der Sybr Green Methode, durch eine höhere Spezifität ausweist. Diese Methode hat lediglich den Nachteil, dass sie durch die relativ hohen Kosten der Synthese und Markierung der TaqMan-Sonden, einen höheren finanziellen Aufwand verursacht.

Die Expressionsmuster der Real Time RT-PCR-Werte der Katze wurden nur tabellarisch dargestellt, da sich zwischen den einzelnen Tieren innerhalb einer Gruppe teilweise erhebliche Unterschiede in der relativen Expression ergaben, und ein Erstellen von Diagrammen daher nicht sinnvoll war. Das Problem dieser Ergebnisse besteht sicherlich darin, dass die Einteilung der Proben in eines der Trächtigkeitsstadien aufgrund morphologischer Kriterien erfolgte und somit eine falsche Zuordnung der einzelnen Tiere möglich wäre. Dennoch würde ein Erstellen von Diagrammen zu einem ähnlichen Bild wie beim Hund führen, und dies gilt sowohl für VEGF als auch für seine beiden Rezeptoren. Die Diskussion bezieht sich daher auf beide Tierarten. In weiteren Untersuchungen wäre es wichtig, Proben von Tieren einzusetzen, deren Graviditätsstadium definitiv bekannt ist.

In situ Hybridisierung (ISH)

Durch den Einsatz der ISH konnte auch eine differenzierte Aussage über das Expressionsmuster der VEGF-mRNA in fetalen oder maternalen Komponenten der caninen und felines Plazenta erfolgen. Die Länge der RNA-Sonde wurde relativ kurz gewählt (186 bp), um möglichst gute Diffusionseigenschaften der Sonde in das fixierte Gewebe zu erreichen (Leitch et al. 1994). Bei der Methode der ISH ist lediglich eine qualitative Aussage über die Expression der mRNA möglich, eine quantitative Aussage über die Anzahl an gebundenen Sonden ist nicht möglich. Als Negativkontrollen wurden Sense-Sonden verwendet, denn bei einer Hybridisierung der RNA-Sonden mit doppelsträngiger DNA könnten auch die Sense-Sonden mit entgegengesetzter Polarität ein Hybrid mit der DNA bilden und dadurch ein falsch positives Signal im Gewebe erzeugen.

4.2 Lokalisation zytoskeotaler Filamente in der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze

Die Identifikation der verschiedenen Zelltypen innerhalb der Plazenta wird durch die Analyse der Expression der verschiedenen Filamente des Zytoskeletts vereinfacht. Diese Methode ist gut etabliert und wurde bereits zur Charakterisierung anderer Plazenta-Typen, wie der epitheliochorialen Plazenta des Rindes (Pfarrer 2006), der hämochorialen Plazenta der Maus, der Ratte, des Meerschweinchens, des Makaken und des Menschen genutzt (Glasser und Julian 1986a; Khong et al. 1986; Blankenship und King 1993; Blankenship et al. 1993a; Carter et al. 1998; Clausen et al. 2003; Nie et al. 2005). Auch an der endotheliochorialen Plazenta des Nerzes (Winther et al. 1999b) und der Katze (Walter und Schonkypl 2006) wurden zytoskeotale Marker zur Identifikation der Gewebearten eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit dienten die immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen die Intermediärfilamente Vimentin und Zytokeratin sowie gegen die aus Aktinuntereinheiten bestehenden Mikrofilamente der immunhistochemischen Identifikation der unterschiedlichen Zellpopulationen in der endotheliochorialen Plazenta des Hundes und der Katze. Außerdem erleichterte die selektive Anfärbung spezifischer Zellpopulationen, wie des Trophoblasten, die Zuordnung zu den Gruppen der Trächtigkeitsstadien. Insbesondere in der Invasionszone gab die Färbung der unterschiedlichen Zelltypen Aufschluss über die vorhandene Dynamik der Entstehung von Deziduazellen parallel zur Invasion von Trophoblastzellen.

Die lichtmikroskopischen Ergebnisse zeigten eine starke Expression des α -sm Actin-Proteins im Myometrium sowie in den fetalen und maternalen Gefäßwänden. Diese Lokalisation war zu erwarten, da α -Aktin Bestandteil von kontraktile Strukturen ist. Im Plazentalabyrinth färbte Aktin die Deziduazellen beziehungsweise die Periendothelzellen sowie das Gefäßendothel der fetalen Kapillaren. Das Gefäßendothel der maternalen Kapillaren zeigte keine positive Reaktion, dafür zeigten die glatten Muskelzellen der maternalen Kapillaren eine deutliche Immunreaktion. In der Invasionszone stellten sich die glatten Muskelzellen der maternalen Arterien positiv dar, und wiederum die Deziduazellen. Auch hier blieb das Gefäßendothel negativ. In der Schicht der Drüsenkammern ist bemerkenswert, dass Aktin die glatten Muskelzellen der Gefäße, nicht jedoch die Endothelien der Kapillaren färbte.

Die Aufgabe des Aktinzytoskeletts in der Zelle besteht darin, sowohl stabile Strukturen wie den kontraktile Apparat der Muskelzelle zu bilden, wie auch veränderliche Strukturen, die an der Zellbewegung Beteiligung finden (Alberts et al. 2004). Durch die dynamische Natur des Aktinzytoskeletts ist die Gestalt der Zelle nicht starr, sondern unterliegt ständigen Veränderungen (Lodish et al. 2001a). Da die Plazenta mit eines der am besten durchbluteten Organe darstellt, ist die Anwesenheit von Aktin in den plazentaren Gefäßen der endotheliochorialen Hunde- und Katzenplazenta von essentieller Bedeutung. Zum einen verleiht das in der vorliegenden Studie detektierte Aktin den Gefäßen ihre notwendige Stabilität, um den Ansprüchen der fetalen Blutversorgung und dem dementsprechend hohen Durchfluss des Blutvolumens standzuhalten, zum anderen gibt die dynamische Struktur und Kontraktilität des Aktinzytoskeletts den Gefäßen die Möglichkeit, sich an der Regulation und Modulation des lokalen plazentaren Blutflusses zu beteiligen. Dies gilt sowohl für die Gefäße des fetalen als auch des maternalen Anteils der Plazenta. Eine Erklärung für eine positive Reaktion der Endothelien der fetalen Gefäße und einer negativen Reaktion der maternalen Endothelien könnte darin liegen, dass die maternalen Plazentagefäße schon wesentlich ausgereifter sind und bereits glatte Muskelzellen und Periendothelzellen enthalten. Da den fetalen Gefäßen dies fehlt, muss deren Stabilität und Kontraktilität der Gefäße durch Aktinfilamente in deren Endothelzellen erreicht werden. Daher können die α -sm Actin-positiven fetalen Endothelzellen, im Hinblick auf die Kontrolle des plazentaren Blutflusses, aktiv zur Regulation des Blutflusses der fetalen Membranen beitragen (Winther et al. 1999b). Auch in der humanen Plazenta wird Aktin zur Identifizierung der glatten Muskulatur der Gefäße verwendet (Labarrere und Faulk 1994; Cavaille et al. 1995), und Untersuchungen an der Plazenta des Meerschweinchens und der Ratte ergaben ebenfalls immunpositive

Ergebnisse für Aktin in der glatten Muskulatur der Gefäße (Clausen et al. 2003; Caluwaerts et al. 2005).

Vimentin befindet sich typischerweise in mesenchymalen Zellen und in den Endothelzellen der Blutgefäße. Im Gebiet der Plazentaforschung wird Vimentin als Marker für mesenchymale Zellen und für stromale Dezidua genutzt (Faulk et al. 1990; Carter et al. 1998; Miglino et al. 2004). Dementsprechend wurde es in der vorliegenden Arbeit vor allem zur Detektion der fetalen und maternalen Endothelien sowie der Deziduazellen eingesetzt. Im Plazentalabyrinth färbte Vimentin mit hoher Intensität das fetale und maternale Gefäßendothel sowie die Periendothelzellen beziehungsweise die Deziduazellen. Dieses entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen an anderen Tierarten, denn die Deziduazellen waren bei Untersuchungen der Plazenta der Ratte, des Nerzes, des Meerschweinchens, der Maus und der Fledermaus sowie dem Menschen und dem Makaken ebenfalls positiv für Vimentin (Glasser und Julian 1986b; Khong et al. 1986; Carter et al. 1998; Winther et al. 1999b; Rasweiler et al. 2000; de Souza und Katz 2001; Osborne et al. 2002). Ebenso zeigte das fetale Mesenchym positive Immunreaktionen. In der Invasionszone waren die Gefäßwände der maternalen Arterien positiv und wiederum die Deziduazellen. In der Schicht der Drüsenkammern färbte Vimentin das Bindegewebe sowie das Endothel der Gefäße. Das Myometrium zeigte eine mäßige Farbreaktion. Epitheliale Zellen waren zu jeder Zeit negativ. Die Herkunft und die Rolle der Deziduazellen sind zur Zeit noch nicht vollständig aufgeklärt. In den meisten Berichten werden sie als dezidualisierte maternale Zellen beschrieben (Leiser und Koob 1993), oder als zu außergewöhnlicher Größe transformierte endometriale Stromazellen (Amoroso 1952). Die in der für diese Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen bestätigen diese Theorie, denn die Expression von Vimentin und die Nicht-Expression von Zytokeratin deuten auf einen stromalen Ursprung dieser Zellen hin. Auch für den Menschen und Nagetiere wurde beschrieben, dass die Dezidua als ein Resultat der dramatischen Proliferation und Differenzierung endometrialer Stromazellen entsteht (Abrahamsohn und Zorn 1993; Gellersen und Brosens 2003). Dass Vimentin als ein Intermediärfilament den Zellen und Geweben ihre mechanische Stabilität verleiht (Alberts et al. 2004), und die Vimentin-Synthese zudem bekanntlich mit Mobilität korreliert ist (Hay 1995), bekräftigt die Annahme, dass sich die Deziduazellen an der Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses bei Hund und Katze beteiligen können. Eine ähnliche Funktion wird auch den Periendothelzellen der Nerzplazenta zugesprochen (Winther et al. 1999b). Auch für die humane Plazenta wird angenommen, dass die Funktion der

Vimentin-positiven Myofibroblasten in der Autoregulation des fetoplazentaren Blutflusses und der mechanischen Stabilität liegt. Die Myofibroblasten fungieren hier eventuell als ein wichtiges Glied, die maternale und fetale Perfusion der Plazenta anzupassen. So kann ein Anstieg des Widerstandes im fetoplazentaren Blutfluss, aus einem hohen Druck resultierend, durch Relaxation der Myofibroblasten herunterreguliert werden (Demir et al. 1997). Die humanen Deziduazellen sind phenotypisch und funktionell mit Myofibroblasten und Perizyten vergleichbar und sind in der humanen Plazenta um die Blutgefäße lokalisiert, woraus die Vermutung entsteht, dass diese kontraktile Zellen eine Rolle in der Regulation des Blutflusses spielen (Oliver et al. 1999; Kimatrai et al. 2003). Diese Funktion ist auch für die Periendothelzellen des Hundes und die Deziduazellen der Katze wahrscheinlich, da das vorliegende Expressionsmuster der zytoskeletalen Bestandteile, sowie deren Lokalisation um die plazentaren Gefäße im Gewebe, für eine solche Funktion dieser Zellen spricht. Zudem könnten die Deziduazellen im Plazentalabyrinth der Katze eine zusätzliche Stützfunktion für die maternalen Gefäße einnehmen, da diese selbst kein Aktin exprimieren.

Zytokeratin ist ein anerkannter Marker für Zellen epithelialen Ursprungs. In der hier vorliegenden Arbeit wurde Zytokeratin als Marker für die invadierenden Trophoblastzellen verwendet, deren Aktivität bis zum Ende der Trächtigkeit andauert. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen färbte Zytokeratin im Plazentalabyrinth vor allem den Synzytiotrophoblasten stark, während der Zytotrophoblast eine vergleichsweise schwächere Farbreaktion aufwies. Dieser Unterschied in der Expression wurde auch bei den Trophoblastpopulationen des Meerschweinchens festgestellt, wo der Zytotrophoblast im Gegensatz zum stärker gefärbten Synzytiotrophoblasten ebenfalls schwach immunreaktiv für Zytokeratin war (Carter et al. 1998). Bei vorherigen Untersuchungen an der Plazenta des Hundes und der Katze wurden keine Unterschiede in der Zytokeratin-Expression innerhalb der Trophoblasttypen festgestellt (Klonisch et al. 1999b; Klonisch et al. 1999a; Walter und Schonkypl 2006). In der Invasionszone zeigte der Trophoblast ein stark positives Signal. In der Schicht der Drüsenkammern wiesen die Zellen des Zylinderepithels eine sehr deutliche positive Immunreaktion auf, und auch in den Epithelzellen der tiefen Drüsenschicht und des Randhämatoms war eine starke Farbreaktion zu finden.

Die Anwesenheit von Zytokeratin in den Trophoblastzellen und im Epithel der Drüsen in der Plazenta von Hund und Katze spiegelt deren ektodermalen Ursprung wieder. Die Zytokeratine dienen der Erhaltung der Form und verleihen den Zellen Stabilität. Die wichtigste Funktion der Intermediärfilamente ist die Verstärkung der Plasmamembran an Stellen, wo Kontakte zu

anderen Zellen oder zur extrazellulären Matrix bestehen (Lodish et al. 2001b). Dies ist gerade in den Zellpopulationen des Trophoblasten, insbesondere des Synzytiotrophoblasten, von entscheidender Wichtigkeit, denn der Synzytiotrophoblast ist diejenige Zellpopulation, die bei der endotheliochorialen Plazentation die Invasion in das maternale Gewebe steuert und als invasive Form das uterine Gewebe erodiert (Leiser und Enders 1980a). Hierbei spielt die Zellstabilität eine entscheidende Rolle. Da der Synzytiotrophoblast einen besonders engen Kontakt zu den Zellpopulationen des maternalen Anteils der Plazenta eingeht, ist eine Verstärkung der Plasmamembran an eben diesen Kontaktstellen eine wichtige Voraussetzung für die Stabilität des Trophoblasten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich des Expressionsmusters aller drei untersuchten Zytoskelettfilamente α -sm Actin, Vimentin und Zytokeratin wurden durch die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, diese beziehen sich allerdings nur auf die Katze (Walter und Schönkypf 2005).

Aktin und Vimentin befinden sich in Zellen mesodermaler Herkunft und sind in Deziduazellen und Periendothelzellen lokalisiert. Zum einen weist dies auf eine Beteiligung dieser Zellen in die Kontrolle der Invasion hin, denn es konnte bereits für den Menschen nachgewiesen werden, dass die Proliferation, Migration und Invasivität der humanen extravillösen Trophoblastzellen innerhalb der Dezidua durch die zwei deziduellen Produkte TGF- β und Decorin kontrolliert werden (Xu et al. 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch die Deziduazellen und/oder Periendothelzellen der Katze und des Hundes eine regulierende Funktion auf die Kontrolle der Trophoblasten-Invasion ausüben könnten. Zum anderen deutet es auf eine Beteiligung dieser Zellen an der Regulation des lokalen placentaren Blutflusses (s. o.). Bei den Untersuchungen an der Plazenta der Katze konnten im Plazentalabyrinth keine Periendothelzellen an den maternalen Gefäßen identifiziert werden, dafür aber große und in reichlicher Anzahl vorhandene Deziduazellen. Diese wiederum weisen ebenfalls das gleiche Expressionsmuster hinsichtlich der zytoskeletalen Bestandteile Aktin und Vimentin auf. Da sich diese Zellen innerhalb des Plazentalabyrinths immer in unmittelbarer Nähe zu den maternalen Gefäßen befinden, kann auch in diesem Fall von einer Beteiligung dieser Zellen an der Regulation des lokalen placentaren Blutfluss ausgegangen werden. Im Gegensatz zum Hund sind im Plazentalabyrinth der Katze auch keine glatten Muskelzellen um die maternalen Gefäße nachweisbar. Dieses Ergebnis, zusammen mit der Abwesenheit von Periendothelzellen, führt zu dem Schluss, dass die Deziduazellen innerhalb des maternalen Anteils des Plazentalabyrinths die einzigen Zellen mit kontraktilem Potential

sind, und daher deren Beteiligung an der Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses sehr wahrscheinlich ist. Die identische Expression von Aktin und Vimentin in Periendothelzellen und Deziduazellen lässt darauf schliessen, dass es sich bei den Periendothelzellen des Hundes und des Nerzes um Deziduazellen mit einem unterschiedlichen Phänotyp handelt.

4.3 Expression von VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 in der caninen und feline Plazenta

Die Expression von VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR/Flk-1) wurde in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien der caninen und feline Plazenta sowohl auf mRNA-Ebene (mittels RT-PCR, Real Time RT-PCR und ISH [nur VEGF]) als auch auf Proteinebene (mittels WB) nachgewiesen und in spezifischen Zellpopulationen lokalisiert (mittels IHC).

4.3.1 Bedeutung des VEGF-Systems für die Angiogenese

Die Expression von VEGF in den Endothelien der plazentaren Gefäße stellt eine wichtige Voraussetzung für die plazentare Neovaskularisation dar, denn die Angiogenese beinhaltet die Migration und Proliferation von Endothelzellen. Wie bereits von Nicosia et al. (1994) beschrieben, induziert VEGF als einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren die Migration und Proliferation der Endothelzellen. Die in der IHC und ISH gefundenen Expressionsmuster zeigen, dass VEGF im Myometrium und den maternalen Endothelzellen exprimiert wird. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden ebenfalls im Myometrium exprimiert, und daraus lässt sich schließen, dass VEGF seine Wirkungen im Myometrium autokrin über seine beiden Rezeptoren vermittelt. Diese VEGF-Wirkungen liegen zu Beginn der Trächtigkeit sicherlich in der Induktion der Angiogenese, denn die maternale Vaskularisierung der Plazenta geht von den Gefäßen des Myometriums aus (Weston et al. 2002), womit das Myometrium die Grundlage für das Entstehen eines plazentaren Austauschsystems von der maternalen Seite her bildet. Zu diesem Zeitpunkt spielt wahrscheinlich das VEGF/KDR-System die Hauptrolle, wohingegen sich die VEGF-Wirkung gegen Ende der Trächtigkeit dann vermutlich in Richtung der Erhaltung und des Überlebens der Endothelzellen verschiebt, so dass nun das VEGF/Flt-1-System die wichtigere Rolle übernimmt (Winther und Dantzer 2001). Die myometrialen Gefäße machen während der Gravidität ein bedeutendes Wachstum und eine Remodellierung durch, um den steigenden Ansprüchen des sich entwickelnden Fetus gerecht

zu werden (Weston et al. 2002) und es wurde nachgewiesen, dass die myometrialen mikrovaskulären Endothelzellen als Antwort auf VEGF migrieren und proliferieren (Gargett et al. 2000). Zudem wäre ein weiterer Denkansatz zu der Expression von VEGF im Myometrium möglich: zusätzlich zu der endothelialen mitogenen Kapazität der VEGF-Familie ist diese bekannt dafür, die Flüssigkeits- und Proteinextravasation von Blutgefäßen zu induzieren. Der Implantationsort von Nagetieren ist durch lokale Ödeme, erhöhte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation charakterisiert (Charnock-Jones et al. 1993). Die Fähigkeit des Endometriums VEGF zu exprimieren bestätigt eine mögliche Beteiligung an diesem Prozess (Charnock-Jones et al. 1993). Auch Sugino et al. (2002) sahen es aufgrund der VEGF Expression im Endometrium als wahrscheinlich an, dass VEGF zu einer erfolgreichen Implantation und Aufrechterhaltung der Gestation durch die erhöhte Gefäßpermeabilität beiträgt. Dementsprechend könnte VEGF auch an den Vorbereitungen zur Implantation von Hund und Katze partizipieren, denn in der vorliegenden Studie wurden in den endometrialen Gefäßendothelien ebenfalls VEGF und seine Rezeptoren detektiert. Möglich wäre auch, dass myometriales VEGF seine Wirkung parakrin über die Rezeptor-exprimierenden Gefäßendothelien des Endometriums vermittelt.

Die hier festgestellte Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im Myometrium und Endometrium stimmt mit in der Literatur gefundenen Angaben überein. So wurde im Myometrium des Menschen die Expression von VEGF nachgewiesen und vermutet, dass es eine Rolle in dessen Angiogenese spielt, und dass Angiogenese durch myometriale VEGF-Produktion wichtig für die uterine myometriale Vaskularisierung ist (Charnock-Jones et al. 1993; Harrison-Woolrych et al. 1995; Taniguchi et al. 2001; Poncelet et al. 2004). Myometriales VEGF in Mutterschafen scheint für mikrovaskuläre Antworten des Myometriums infolge Östradiol-Gaben verantwortlich zu sein und dementsprechend für angiogene Vorgänge (Reynolds et al. 1998). Beim Schwein wurde aufgrund der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren im Myometrium eine funktionelle Rolle von VEGF in glatten Muskelzellen vermutet (Winther et al. 1999a). Beim Marmosettaffen wurde auf eine Involvierung von VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 in die Vorbereitung des Endometriums für die Implantation geschlossen (Rowe et al. 2003). Auch für Kaninchen wurde aufgrund der endometrialen Expression des VEGF-Systems angenommen, dass VEGF die Induktion der Gefäßhyperpermeabilität während der Implantation und die folgenden angiogenen Prozesse beeinflusst (Das et al. 1997). Wang et al. (2003) vermuteten, dass VEGF in die Förderung des endometrialen Gefäßwachstums und die Gefäßrekonstruktion involviert ist, was für eine adäquate Empfänglichkeit während der frühen Gravidität des Rhesusaffen benötigt wird. Bei

Untersuchungen an Plazenten des Goldhamsters wurde angenommen, dass VEGF zusätzlich zu seiner Wirkung auf die endometriale Angiogenese und Gewebeschwellung die Proliferation und Differenzierung des Endometriums erleichtern könnte (Yi et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wird VEGF in Endothelien des fetalen Mesenchyms und des Endometriums exprimiert. Sowohl fetale als auch maternale Gefäßendothelien zeigten in der IHC grundsätzlich eine deutliche VEGF Expression.

Die Anwesenheit von VEGF in den fetalen Endothelzellen kann eine weitergehende Vervielfältigung der Choriongefäße fördern. Dabei ist zu bemerken, dass die Endothelien der Gefäße im Bereich der Chorionplatte häufig die deutlichste Reaktion zeigten, was auf eine vergleichsweise hohe Expression von VEGF gerade an der Basis der Lamellen hindeutet und vermuten lässt, dass das Wachstum/die Sprossung von Gefäßen gerade in diesem Bereich erfolgt und somit widerspiegelt, wie wichtig die Entstehung weiterer Gefäße in diesem Bereich ist, um eine adäquate Blutversorgung und einen adäquaten Nährstofftransfer zu ermöglichen und eine Weiterentwicklung der Plazenta sicherzustellen. Auch in der Schafplazenta wurde eine Involvierung von VEGF in die Regulation des Auswachsens der Blutgefäße innerhalb der fetalen Zotten vermutet (Regnault et al. 2002). Für die Plazenta des Rhesusaffen wurde ebenfalls angenommen, dass VEGF in die fetoplazentare Gefäßdifferenzierung und -entwicklung involviert ist (Wang et al. 2003), und dass die Anwesenheit von VEGF in den fetalen Kompartimenten die Angiogenese innerhalb der Zotten unterstützt (Wei et al. 2004b).

Eine deutliche Flt-1-Immunreaktion in den Endothelien der maternalen und fetalen Gefäße spricht vermutlich dafür, dass die neu gebildeten Gefäße nun aufrechterhalten werden müssen. Die starke endotheliale Flt-1-Expression ist über die gesamte Gravidität hin konstant, so dass von einer permanenten Flt-1-vermittelten VEGF-Wirkung während der gesamten Trächtigkeit ausgegangen werden kann. Vermutlich übt VEGF seine Wirkungen hier zum einen autokrin aus, da es ebenfalls in den Gefäßendothelien lokalisiert ist, zum anderen parakrin von den direkt benachbarten Deziduazellen aus. Im Gegensatz zu den hier ermittelten Ergebnissen, wo die Endothelien während der gesamten Gravidität Flt-1 gleichermaßen stark exprimieren, ergaben Untersuchungen an der Plazenta des Nerzes, dass die Immunreaktivität für Flt-1 erst in der späten Gestation stark wird (Winther und Dantzer 2001). In der aktuellen Studie zeigte KDR dagegen ein unterschiedliches Färbeverhalten in den Endothelien. Wider Erwarten war im Plazentalabyrinth von Hund und Katze nur eine schwache Färbung der maternalen Endothelien festzustellen. Dagegen zeigten Endothelien in der Invasionszone eine deutlichere

Färbung, was darauf schließen lässt, dass die Neubildung der Gefäße vor allem von den Gefäßen der Invasionszone ausgeht. Die kleineren Gefäße des maternalen Plazentalabyrinths scheinen nicht die gleiche Fähigkeit zur Bildung weiterer Gefäße zu haben, und wenn nur in wesentlich geringerem Umfang, da sie nur eine geringe KDR Expression aufweisen. In den Gefäßen des Chorions zeigte KDR eine mäßige Farbreaktion. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in den fetalen Anteilen der Plazenta vorwiegend kleine Gefäße wie Kapillaren ausgebildet werden, aus welchen die Neubildung von weiteren Kapillaren ausgehen muss. Hierfür ist sicherlich die KDR-vermittelte VEGF-Wirkung verantwortlich. So wurde beim Marmosettaffen aufgrund der endothelialen KDR-Expression in Mesenchymzellen, Choriongefäßen und fetalen Kapillaren dessen Verantwortlichkeit für die endotheliale Zelldifferenzierung vermutet, sowie ein durch KDR vermitteltes Wachstum der fetalen Blutgefäße (Wulff et al. 2002). Beim Menschen wurde die Expression von KDR in den plazentaren Gefäßendothelien ebenfalls mit der Differenzierung und dem Wachstum neu geformter Endothelzellen assoziiert (Clark et al. 1996). Auch in der caninen und felines Plazenta kann davon ausgegangen werden, dass die Neubildung der Gefäße aufgrund der Kollokalisierung von VEGF und KDR in den Gefäßendothelien stattfindet. So zeigten Endothelzellen der Aorta des Schweins, denen VEGF-Rezeptoren fehlen, Chemotaxis und Mitogenese als Antwort auf VEGF, wenn sie mit KDR-kodierendem Plasmid transfiziert wurden (Waltenberger et al. 1994), und an Endothelzellen der Aorta des Rindes wurde nachgewiesen, dass KDR für die VEGF-vermittelte Proliferation und Migration der Endothelzellen verantwortlich ist (Bernatchez et al. 1999). Das hier erhaltene Ergebnis der eher schwachen Expression von KDR in den plazentaren Gefäßen stimmt mit den Ergebnissen überein, die Demir et al. (2004) bei Untersuchungen an der humanen Plazenta erhielten. Auch hier wurde nur eine schwache oder nicht vorhandene Immunreaktion für KDR im Gefäßendothel erzielt (Demir et al. 2004).

Die Lokalisation des VEGF Ligand-Rezeptor-System in den maternalen und fetalen Kapillaren der caninen und felines Plazenta stimmt mit dem bekannten mitogenen Effekt von VEGF auf Endothelzellen überein und spiegelt die direkte Beteiligung von VEGF an angiogenen Prozessen, wie der Neubildung plazentarer Gefäße und der anschließenden Erhaltung der Gefäßintegrität, wider.

Zudem ist VEGF dafür bekannt, dass es die Gefäßpermeabilität erhöht (Persson und Rodriguez-Martinez 1997; Rowe et al. 2003). Der fetale Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff während der frühen Gravidität muss durch Diffusion über die feto-maternale Verbindung befriedigt werden, ein Prozess der in entscheidendem Maße von der Gefäßpermeabilität

abhängt (Rowe et al. 2003). Die Lokalisation von VEGF in den Gefäßendothelien spiegelt also zusätzlich die Aufgabe von VEGF wider, die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff durch die Endothelzellen hindurch in der frühen Gravidität zu ermöglichen und zu erleichtern. Untersuchungen an verschiedenen anderen Spezies und Plazentationstypen bestätigen die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in den plazentaren Gefäßendothelien. In der hämochorialen Plazenta des Menschen und des Pavian wurde die Koloakalisation des VEGF-Systems mit seiner bekannten Rolle in der Vaskulogenese und Angiogenese in Verbindung gebracht und dementsprechend mit der plazentaren Neovaskularisation (Helske et al. 2001; Hildebrandt et al. 2001). Es wurde vermutet, dass VEGF durch Flt-1- und KDR-vermittelte Wirkung zu einer erfolgreichen Implantation und Aufrechterhaltung der Gestation durch die erhöhte Gefäßpermeabilität oder Formation des dichten Gefäßnetzwerkes beiträgt (Sugino et al. 2002). Auch beim Rhesusaffen wird von einer Involvierung der endothelialen VEGF/VEGFR-Paare in den Prozess der maternalen Gefäßtransformation und der fetoplazentaren Gefäßdifferenzierung und Entwicklung während der frühen Gravidität ausgegangen, sowie von einer Involvierung in die Gefäßpermeabilität (Wang et al. 2003; Wei et al. 2004a; Wei et al. 2004b). Des Weiteren wurde beim Marmosettaffen wegen der endothelialen Koexpression beider Rezeptoren von einer Involvierung des VEGF-Systems in die Präparation des Endometriums für die Implantation und in die Remodellierung des maternalen Gefäßsystems ausgegangen (Rowe et al. 2003). Bei Untersuchungen an der epitheliochorialen Schweineplazenta und der endotheliochorialen Plazenta des Nerzes zeigte sich ebenfalls eine Koloakalisation von VEGF und seine Rezeptoren in den fetalen und maternalen Gefäßendothelien (Winther et al. 1999a; Winther und Dantzer 2001). In der Plazenta des Nerzes war die KDR-Immunreaktion der Gefäßendothelien vor allem zu Beginn der Gestation stark, die Flt-1-Immunreaktion dagegen erst in der späteren Gravidität. Daher wurde vermutet, dass die VEGF/KDR-Interaktion das Hauptsignal während der initialen Angiogenese ist, während die VEGF/Flt-1-Interaktion wichtig für die Erhaltung der Gefäßintegrität in den späten Stadien der Gravidität ist (Winther und Dantzer 2001). VEGF scheint in der frühen Plazentation als angiogener Faktor wichtig für die Neovaskularisation zu sein, in den späteren Gestationsstadien könnte VEGF die Gefäßinvolution inhibieren (Winther et al. 1999a). Auch in der Plazenta des Goldhamsters wurde die Expression von VEGF, Flt-1 und KDR in den Gefäßendothelien mit der bekannten Rolle von VEGF in der Angiogenese und Gefäßpermeabilität in Verbindung gebracht (Yi et al. 1999). In der epitheliochorialen Schafplazenta wurde eine Involvierung des endothelialen VEGF in die Regulation des plazentaren Blutflusses angenommen, zusätzlich zu seiner Rolle in der plazentaren

Angiogenese (Reynolds und Redmer 2001), und in der epitheliochorialen Rinderplazenta wurde die Kolokalisation des VEGF-Systems in den Gefäßendothelien ebenfalls mit seinen klassischen Funktionen in der Angiogenese und Gefäßpermeabilität assoziiert (Pfarrer et al. 2006). Entgegen den hier erhaltenen Ergebnissen der Expression von VEGF in den fetalen und maternalen Gefäßendothelien schreiben andere Autoren jedoch, dass direkt agierende Angiogene wie VEGF von vielen Zelltypen synthetisiert und sezerniert werden können, aber nicht von den Endothelzellen selber (Norrby 1997; Rowe et al. 2003).

Die positive Immunreaktion der fetalen Mesenchymzellen lässt sich sehr einfach erklären, da der Trophoblast per se ein avaskuläres Gewebe ist, welches eine funktionsfähige Zirkulation entwickeln muss, um am maternal-fetalen Austausch teilhaben zu können. Daher sind auf der fetalen Seite zwei Prozesse, Vaskulogenese und Angiogenese, in die Gefäßentwicklung involviert (Wulff et al. 2003). Unter der Vaskulogenese versteht man die Formation erster primitiver Kapillaren durch Differenzierung hämangiogener Stammzellen, die von pluripotenten Mesenchymzellen stammen. Die daraus resultierenden Angioblasten entwickeln sich zu endothelialen Vorläuferzellen (Demir et al. 2006). Dementsprechend exprimieren bereits die fetalen Mesenchymzellen VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2, denn sie werden sich später zu den Endothelien der plazentaren Gefäße weiterentwickeln.

Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass die VEGF-, Flt-1- und KDR-mRNA in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien im Plazentahomogenat von Hund und Katze exprimiert wird. Um eine Aussage über die Menge der exprimierten mRNA und das Expressionsniveau treffen zu können, wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Real Time RT-PCR durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass das Expressionsniveau von VEGF in der frühen Gravidität am höchsten war und bis zum Ende der Gravidität kontinuierlich sank. Die Begründung dafür liegt wahrscheinlich in einer „initialen Angiogenese“ (Winther et al. 1999a). Während der initialen Plazentation ist eine intensive Angiogenese von essentieller Bedeutung, denn nur so kann eine adäquate Neovaskularisierung und die Bildung eines funktions- und leistungsfähigen plazentaren Kreislaufsystems stattfinden. Daher ist eine anfänglich hohe Expression von VEGF im ersten Drittel der Gravidität für eine erfolgreiche Plazentation vermutlich notwendig, um die Gefäßentwicklung während der frühen Gestation anzutreiben. Für den Menschen wurde vermutet, dass in der frühen Schwangerschaft der niedrige Sauerstoff-Partialdruck die lokale VEGF-Produktion erhöht, welche wiederum die aktive Angiogenese, die in den sich entwickelnden Villi geschieht, aufrechterhält und unterstützt (Zhang et al. 2002). Dementsprechend wäre auch beim Menschen, wie hier bei

Hund und Katze, zu Beginn der Gestation ein hohes VEGF-mRNA Expressionsniveau zu finden.

Auch in den späten Gestationsstadien des Schweins ist die Angiogenese minimal (Winther et al. 1999a). Diese Tatsache dürfte auf die Gestation des Hundes und der Katze übertragbar sein und bestätigt die Annahme, dass VEGF nicht nur als angiogener Faktor agiert. Zwar zeigt die hier durchgeführte Real Time RT-PCR deutlich, dass die VEGF-Expression zum Ende der Gestation hin eindeutig abnimmt, aber sie findet weiterhin auf einem niedrigeren Niveau statt. VEGF muss also weitere Funktionen innehaben als die Induktion der Angiogenese. Zum Einen vermittelt Flt-1 seine Überlebensfunktion auf Endothelzellen. Weiterhin deuten diese Ergebnisse aber auch darauf hin, dass VEGF in die Kontrolle der Trophoblasteninvasion involviert ist, und bis zum Ende der Gravidität an einer Verhinderung eines übermäßigen Wachstums des Trophoblasten partizipiert; denn wie auch für Endothelzellen könnte Flt-1 eine antiproliferative Wirkung haben und das Zellwachstum inhibieren (Bussolati et al. 2001). Die abnehmenden VEGF mRNA-Level bei Hund und Katze nahe der Geburt gehen mit der starken Reduktion der Trophoblastzellen zu dieser Zeit einher, denn diese Zellen sind einer der Hauptexpressionsorte von VEGF. Bei Untersuchungen an der Plazenta des Rhesusaffen wurde mittels IHC und ISH ebenfalls festgestellt, dass die VEGF-Immunreaktivität mit fortschreitender Gravidität abnimmt (Wei et al. 2004b), was mit den hier ermittelten Real Time Ergebnissen für VEGF übereinstimmt; auch Wulff et al. (2002) wiesen im Northern Blot einen Abfall der VEGF mRNA nahe der Geburt nach.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die Expression von Flt-1 in den ersten beiden Graviditätsdritteln auf eher niedrigem Niveau stattfindet und am Ende der Gravidität hochsignifikant ($p=0,0014$) steigt. Für dieses Expressionsmuster gibt es zwei Erklärungsansätze. Zum Einen wird Flt-1 auch als Negativregulator der VEGF-Signalwirkung angesehen (Hornig und Weich 1999; Ferrara 2001). In den späten Stadien der Gravidität ist die Angiogenese nun nicht mehr so wichtig, wie bereits beschrieben findet sie nur noch minimal statt (Winther et al. 1999a). Daher ist eine hohe Expression von Flt-1 als Negativregulator der VEGF-Wirkung nicht mehr gefährdend für den Fetus. Zum Zweiten ist Flt-1 dafür bekannt, dass es der Erhaltung der Gefäßintegrität und dem Überleben der Endothelzellen dient (Fong et al. 1995). Dementsprechend könnte eine hohe Flt-1-Expression im letzten Drittel der Gravidität sehr wichtig sein, da die Plazenta fertig entwickelt ist und ein adäquates Austauschsystem gebildet wurde, nun aber für dessen Aufrechterhaltung und Überleben gesorgt werden muss. Dieses könnte durch die über Flt-1 vermittelte VEGF-Wirkung geschehen, was das hohe Flt-1-Expressionsniveau zum Gestationsende erklären würde. Zudem ist der Anstieg der Flt-1

mRNA vermutlich auch rein histologisch zu erklären, denn bei fortschreitender Gravidität steigt die Zahl der maternalen und fetalen Kapillaren und die Zahl der Choriongefäße. Dieser Anstieg in der Gesamtzahl der Blutgefäße, welche die Hauptlokalisation der Flt-1-Expression darstellen, könnte den Anstieg des Flt-1-mRNA Niveaus erklären.

Die KDR mRNA-Expression dagegen war in den frühen Stadien der Gravidität und am Ende der Gravidität niedrig, mit einem signifikanten Anstieg ($p \leq 0,05$) in der Gestationsmitte. Dieses ist teils mit dem Expressionsmuster der VEGF-mRNA erklärbar, denn VEGF hat sein höchstes Expressionsniveau im ersten Drittel der Gestation. Zum Anderen hat KDR zwar eine geringe Affinität, gleichzeitig aber eine hohe Tyrosinkinaseaktivität (Norrby 1997), so dass zu diesem Zeitpunkt eine geringere Anzahl an Rezeptoren ausreicht, um die volle VEGF-Signalwirkung zu erzielen. In der Gestationsmitte sank die Expression der VEGF-mRNA nun, und es ist zu vermuten, dass KDR - der Haupt-Signalrezeptor für die VEGF-Wirkung - nun in höherem Maße exprimiert werden muss, damit er das volle Wirkungsspektrum des geringer exprimierten VEGF vermitteln kann. Das niedrige Expressionsniveau am Ende der Gravidität spricht wieder dafür, dass die Angiogenese in den späten Gestationsstadien minimal ist und daher die Anwesenheit einer hohen Anzahl von KDR-Rezeptoren nicht mehr notwendig ist, da ihre Funktion nicht mehr, beziehungsweise nur noch in geringem Maße, benötigt wird. Hier wird nun noch einmal deutlich, dass am Ende der Trächtigkeit die Flt-1-Wirkung die vermutlich wichtigere ist, um das während der Gravidität gebildete plazentare Austauschsystem aufrechtzuerhalten, und die KDR-Wirkung an Bedeutung verliert. Denselben Schluss zog die Arbeitsgruppe Dantzer et al. (2000), die für die Spezies Schwein, Rind und Nerz vorschlägt, dass die VEGF-KDR Interaktion das Hauptsignal während der initialen Plazentaangiogenese ist, wohingegen während der späten Trächtigkeit die VEGF-Flt-1 Interaktion wichtiger für die Regulation und der Erhaltung der Gefäßintegrität ist.

Übereinstimmend mit den hier für die Rezeptoren ermittelten Ergebnissen in der caninen und felines Plazenta wiesen Wulff et al. (2002) für den Marmosettaffen im Northern Blot einen Anstieg der Flt-1 Gesamt-mRNA bis zur Geburt während der zweiten Hälfte der Gestation nach und einen Anstieg der KDR Gesamt-mRNA während der zweiten Hälfte der Gestation.

Da Plazentagewebe ein hohes Ausmaß an Angiogenese zeigt, ein Prozess, der für Gewebewachstum und Plazentamorphologie verantwortlich ist (Dantzer et al. 2000), und VEGF einer der Hauptfaktoren der Vaskulogenese und Angiogenese ist (Ribatti 2005), der für die Regulation vaskulärer Veränderungen verantwortlich ist (Lopes et al. 2003), liegt seine Bedeutung in der caninen und felines Plazenta sicherlich darin, dass er eine Hauptrolle in der

Regulation der plazentaren Angiogenese spielt. Dafür spricht die Lokalisation von VEGF und seinen Rezeptoren in den Endothelzellen der maternalen und fetalen plazentaren Gefäße sowie in den Mesenchymzellen, den Vorläuferzellen der Endothelzellen. Dieses Expressionsmuster wurde nicht nur wie hier für Hund und Katze beschrieben, sondern bereits bei anderen Tierarten wie dem Schwein (Winther et al. 1999a), dem Rind (Pfarrer et al. 2006) und dem Nerz (Winther und Dantzer 2001) nachgewiesen und auch hier mit angiogenen Prozessen in Verbindung gebracht. VEGF besitzt zwei wichtige angiogene Eigenschaften: die direkte Induktion der Angiogenese und die Induktion einer Gefäßhyperpermeabilität, die ebenfalls zu einer gesteigerten Angiogenese führt (Klagsbrun und D'Amore 1996). Beides ist für die Plazentation von essentieller Bedeutung. Einmal der Prozess der Angiogenese, zur Etablierung eines adäquaten plazentaren Kreislaufsystems, um den Nährstoff- und Sauerstofftransfer zwischen Mutter und Fetus zu ermöglichen. Zum anderen spielt vermutlich auch die erhöhte Gefäßpermeabilität gerade zu Beginn der Gravidität eine zusätzliche Rolle, da der fetale Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff während der frühen Gravidität durch Diffusion über die feto-maternale Verbindung befriedigt werden muss (Rowe et al. 2003).

Während der Trächtigkeit stellen ein steigender uteriner Gefäßwiderstand und reduzierter uteriner Blutfluss ein hohes Risiko dar und sind mit der Retardation fetalen Wachstums assoziiert. Demzufolge haben Faktoren, die die plazentare Gefäßentwicklung und -Funktion beeinflussen, eine dramatische Wirkung auf das fetale Wachstum und die Entwicklung, und somit auf das neonatale Überleben und Wachstum (Reynolds und Redmer 2001). Damit liegt die Bedeutung von VEGF und seinen Rezeptoren in der caninen und felines Plazenta eindeutig darin, dass sie zu eben jenen Faktoren zählen und darum einen positiven Einfluss auf die Plazentation an sich sowie auf das neonatale Überleben und Wachstum ausüben.

Zusätzlich zu seiner Rolle in der plazentaren Angiogenese könnte VEGF auch in die Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses involviert sein, denn dafür spricht seine Lokalisation in den Deziduazellen bzw. Periendothelzellen. Durch die unmittelbare Nachbarschaft dieser Zellen zu den maternalen Plazentagefäßen und die Expression von sowohl VEGF als auch seinen Rezeptoren erscheint eine solche Rolle für VEGF in der caninen und felines Plazenta wahrscheinlich. Zudem wurde VEGF mit der Stimulation der endothelialen Produktion von Stickoxid in Zusammenhang gebracht, einem der bedeutendsten lokalen Vasodilatoren, der den Östrogen-induzierten Anstieg des uterinen Blutflusses vermittelt (Reynolds und Redmer 2001), was die Annahme einer Beteiligung von VEGF an der Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses bestätigen würde.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die Expression von Angiogenesefaktoren essentiell für eine adäquate plazentare Angiogenese und Vaskulogenese ist, und diese beiden Prozesse wiederum entscheidend für die Etablierung und Aufrechterhaltung eines fetoplazentaren Blutkreislaufs und somit für normales fetales Wachstum und Entwicklung sind. Zukünftig wäre es wichtig zu erforschen, inwieweit Graviditätspathologien Dysregulationen in der Expression von Schlüsselfaktoren der Angiogenese, wie VEGF, reflektieren. Beim Menschen beispielsweise wurde bereits herausgefunden, dass bei dem Krankheitsbild der intrauterinen Wachstumsretardation die Expression von VEGF durch den Trophoblasten geringer war als in der normalen Gravidität (Vuorela et al. 2000). Weiterhin sind bei der Präeklampsie des Primaten, wo die Trophoblasteninvasion gestört ist, die VEGF und Flt-1 Level herabgesetzt (Wulff et al. 2003).

4.3.2 Bedeutung des VEGF-Systems für die Trophoblastenregulation

Sowohl VEGF als auch Flt-1 und KDR waren auf fetaler Seite im Trophoblasten detektierbar. Auch in dieser Zellpopulation ist somit eine Kolo-kalisation von VEGF und seinen Rezeptoren nachgewiesen worden. Die Expression des kompletten VEGF-Systems in den Trophoblastzellpopulationen untermauert die Annahme, dass VEGF nicht nur angiogene Wirkungen ausüben kann, sondern zudem eine autokrine Rolle in der Regulation der Trophoblastenfunktion innehaben könnte; zum Einen in der Trophoblastendifferenzierung an sich sowie auch in der Trophoblasteninvasion. Auch Cooper et al. (1995) nahmen bei Untersuchungen an der Plazenta des Menschen an, dass VEGF nicht nur in die Regulation der plazentaren Angiogenese involviert ist, sondern auch in die Trophoblasteninvasion. Sie fanden heraus, dass der Trophoblast sowohl die Flt-1-mRNA als auch das -Protein exprimiert, und dass es mit VEGF kolo-kalisiert ist. Die Ergebnisse, dass das VEGF Ligand-Rezeptor-System im Primaten vom Trophoblasten exprimiert wird, wurden von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Diese vermuteten aufgrund der Expression von VEGF und Flt-1 in Trophoblastzellen eine Rolle von VEGF in Bezug auf das Wachstum, die Migration und die Differenzierung des Trophoblasten (Charnock-Jones et al. 1993; Charnock-Jones et al. 1994; Clark et al. 1996; Shore et al. 1997). Durch die Koexpression von VEGF und Flt-1 im Trophoblasten wurde auf eine autokrine Beeinflussung der Trophoblastenfunktion während der Gravidität sowie auf eine Rolle von VEGF in der Trophoblasteninvasion geschlossen (Shore et al. 1997; Wulff et al. 2002; Wulff et al. 2003). Die Theorie der Beteiligung von VEGF an der Regulation der Trophoblastenfunktion bestätigend, fanden Athanassiades et al.

(1998) heraus, dass VEGF in der Zellkultur proliferationsfördernd auf den Trophoblasten einwirkt. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe ergaben eine Koexpression von VEGF und seinen Rezeptoren Flt-1 und KDR in kultivierten EVT (extravillous trophoblast)-Zellen, was auf eine autokrine Rolle von VEGF auf die Entwicklung des extravillösen Trophoblasten hinweist (Athanassiades et al. 1998). Zudem wurde anhand einer EVT-Zelllinie herausgefunden, dass VEGF die Trophoblastenmotilität erhöht (Lash et al. 1999). Auch Hildebrandt et al. (2001) beschrieben den villösen Zytotrophoblasten als eine der Hauptquellen für VEGF und ebenfalls die dortige Expression von Flt-1. Einige Autoren vermuten aufgrund der Expression von VEGF und Flt-1 im Trophoblasten vor allem eine Rolle von VEGF im Hinblick auf die Trophoblast-abhängige parakrine Induktion der plazentaren Angiogenese, aber auch eine Rolle in Bezug auf die Trophoblastenfunktion (Helske et al. 2001; Geva et al. 2002; Demir et al. 2004). Aufgrund der Koexpression von VEGF und KDR im Zytotrophoblasten wurde eine Involvierung von VEGF in die Zytotrophoblastenproliferation und Migration angenommen und es wurde vermutet, dass VEGF wichtig für das Überleben der invadierenden Zytotrophoblastzellen während der Transformation sein könnte (Wei et al. 2004b). Auch für andere Tierarten wurden VEGF und/oder seine Rezeptoren im Trophoblasten detektiert, so zum Beispiel in den Trophoblast-Riesenzellen der Maus und der Ratte (Breier et al. 1992; Jakeman et al. 1993) sowie in den Trophoblastzellen des Nerzes (Winther und Dantzer 2001; Lopes et al. 2003), des Schweins (Winther et al. 1999a) und des Rinds (Pfarrer et al. 2006). Hier wird ebenfalls davon ausgegangen, dass das VEGF-System eine Rolle als Mediator für das Zellwachstum und die Differenzierung des Trophoblasten innehat, zusätzlich zu seiner Funktion als Endothelzellmitogen, und es wird vermutet, dass es die Trophoblasteninvasion sowie die Transporteigenschaften des Trophoblasten beeinflussen kann (Winther et al. 1999a; Winther und Dantzer 2001; Pfarrer et al. 2006). He et al. (1999) stellten die These auf, dass aufgrund der Tatsache, dass die Migration von Monozyten/Makrophagen als Antwort auf VEGF durch Flt-1 vermittelt wird (Barleon et al. 1996; Clauss et al. 1996), es möglich sein könnte, dass Flt-1, da dessen mRNA im Trophoblasten detektiert wurde, die Migration von Trophoblastzellen regulieren kann. Des Weiteren wurde festgestellt, dass VEGF die Trophoblastenmotilität erhöht, und es wurde spekuliert, dass die erhöhte Motilität als Antwort auf VEGF eine initiale Antwort zum Anlocken der Trophoblastzellen zu der Dezidua sein kann, und dass VEGF dann das Ausmaß, in welchem die Trophoblastzellen eindringen, limitieren kann (Kunath et al. 2004).

Im Hinblick auf eine Rolle in der Regulation der Trophoblastenfunktion wurde beschrieben, dass die zeitliche und räumliche Regulation der Trophoblasteninvasion vermutlich auf autokrinem Weg durch trophoblastische Faktoren und auf parakrinem Weg durch uterine Faktoren vermittelt wird. Verschiedene Typen von Regulatoren wurden bereits untersucht, wie Hormone, extrazelluläre Matrixglycoproteine sowie Zytokine oder Wachstumsfaktoren (Bischof et al. 2000; Bischof et al. 2001). Auf die hier erhaltenen Ergebnisse würde sich dies folgendermaßen übertragen lassen: zu den trophoblastischen Faktoren können in der caninen und felines Plazenta VEGF und seine Rezeptoren gezählt werden, denn der Trophoblast exprimiert sowohl VEGF als auch seine beiden Rezeptoren. Ebenso trifft dies für die uterinen Faktoren zu, denn sowohl das Myometrium wie auch die Deziduazellen exprimieren das gesamte hier untersuchte VEGF-System. Dementsprechend bestünde die Möglichkeit, dass das VEGF-System auf autokrinem Weg wie auch auf parakrinem Weg an der Regulation der Trophoblasteninvasion in der caninen und felines Plazenta teilhaben könnte. Aus den im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass nicht nur das Gefäßendothel, sondern auch die Trophoblastzellen potentielle Ziele der VEGF-Aktion sind und dass maternales VEGF eine parakrine Rolle und fetales VEGF eine autokrine Rolle in der Regulation der Entwicklung und Funktion der Trophoblastzellen ausüben könnte. Zudem scheint das maternale VEGF der Deziduazellen/Periendothelzellen parakrin an der Regulation der Invasion des Trophoblasten beteiligt zu sein. Die Möglichkeit einer Beteiligung von VEGF in die Regulation der Kontrolle der Trophoblasteninvasion aufgrund der dortigen Expression wurde bereits, wie oben beschrieben, von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen in Betracht gezogen (Charnock-Jones et al. 1994; Cooper et al. 1995; Clark et al. 1996; Lash et al. 1999; Wulff et al. 2002; Rowe et al. 2003; Wang et al. 2003; Wulff et al. 2003).

Die Anwesenheit von VEGF, Flt-1 und KDR in Drüsenepithelzellen weist auf eine funktionelle Rolle von VEGF auch auf diese Zelltypen hin. Während der Gestation sind sowohl die synthetischen als auch die sekretorischen Aktivitäten in den uterinen Drüsenepithelien hoch. Darum kann man spekulieren, dass das VEGF Ligand-Rezeptor-System die zelluläre Differenzierung und sekretorische Aktivität im uterinen Drüsenepithel beeinflusst, somit die Zellen für ihre prädisponierten Verpflichtungen ausbildend (Winther et al. 1999a). Zudem könnte die Tatsache, dass das komplette VEGF-System in den Epithelien der Drüsenkammern und Drüsenschichten lokalisiert ist bedeuten, dass es von dort aus chemotaktisch auf den Trophoblasten wirkt und so die Invasion bis zum Ende der Trächtigkeit andauern kann. Ein weiterer möglicher Denkansatz wäre, dass von den Drüsenepithelien aus

eine negative Regulation der Trophoblasteninvasion stattfindet, und somit durch Rezeptorvermittelte autokrine VEGF-Wirkungen ein übermäßiges Wachstum des Trophoblasten in die maternalen Gewebeschichten verhindert wird.

Bei immunhistochemischen Untersuchungen an der Plazenta von Schwein, Nerz, Affe und Rind zeigte sich ebenfalls, dass die Drüsenepithelien das komplette VEGF-System exprimieren (Winther et al. 1999a; Winther und Dantzer 2001; Lopes et al. 2003; Rowe et al. 2003; Wang et al. 2003; Wei et al. 2004a; Pfarrer et al. 2006). Die intensive Immunreaktivität des VEGF Ligand-Rezeptor-Systems in den uterinen Drüsenepithelien des Schweins, Nerzes, Rhesusaffen und Rindes sowie des Hundes und der Katze während der gesamten Gestation deutet auf eine lokale VEGF-Wirkung und eine Auswirkung von VEGF auf die Differenzierung der uterinen Drüsenzellen und die sekretorische Aktivität hin und auf die weitere Funktion von VEGF als ein Mediator des Zellwachstums und der -Differenzierung (Winther et al. 1999a; Winther und Dantzer 2001; Rowe et al. 2003; Wang et al. 2003; Wei et al. 2004a). Zudem wurde aufgrund der Expression des VEGF-Systems in den Drüsenepithelien angenommen, dass es einen Einfluss auf die Transporteigenschaften des Drüsenepithels haben könnte (Winther et al. 1999a). Die immunhistochemische Expression von VEGF, Flt-1 und KDR in anderen Zelltypen als Endothelzellen, befürwortet eine Rolle von VEGF als ein Mediator für Zellwachstum und -Differenzierung zusätzlich zu seiner Funktion als Endothelmitogen (Winther und Dantzer 2001).

4.3.3 Rolle der Deziduazellen

Die Lokalisation von VEGF in den Deziduazellen und Periendothelzellen sowie deren Lokalisation im Gewebe lässt stark darauf schließen, dass sie in die Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses und zudem ebenfalls in die Kontrolle der Trophoblasteninvasion involviert sind. Einerseits bietet ihre Lokalisation in direkter Nachbarschaft zu den maternalen Gefäßen ihnen die Möglichkeit, durch VEGF auf parakrine Art und Weise angiogene Prozesse in der caninen und felines Plazenta einzuleiten oder aufrechtzuerhalten und auf die Endothelzellen einzuwirken. Zusätzlich stellen sie durch ihre günstige Lage unmittelbar neben den maternalen Gefäßen möglicherweise eine Schutzfunktion vor übermäßiger Trophoblasteninvasion dar. Da auch die beiden Rezeptoren Flt-1 und KDR in den Deziduazellen lokalisiert sind, ist es denkbar, dass VEGF eine autokrine Wirkung über die Rezeptoren ausübt und die Deziduazellen unter anderem durch die Expression des VEGF-Systems in der Lage sind, eine übermäßige Trophoblasteninvasion zu verhindern und die

maternalen plazentaren Gefäße vor einer Zerstörung durch den Trophoblasten zu schützen. Deziduazellen wird in hämochorialen Plazenten eine Rolle bei der Invasionskontrolle zugesprochen (Bevilacqua und Abrahamsohn 1994; Xu et al. 2002; Goffin et al. 2003). Sie könnten das Wachstum des Trophoblasten in die maternalen Gefäße verhindern, denn ein eindeutiges Kennzeichen der endotheliochorialen Plazentation ist der Abbau des maternalen Gewebes ohne Beschädigung der Gefäße (Grosser 1927). Die positive Farbreaktion der Deziduazellen der Katze war im letzten Drittel der Gravidität am deutlichsten im Vergleich zu den beiden ersten Dritteln. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Expression von VEGF - wie schon in der Diskussion der Real Time RT-PCR beschrieben - insgesamt gegen Ende der Gravidität deutlich abnimmt, aber VEGF für die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität und das Überleben der Endothelzellen dennoch von essentieller Bedeutung ist. Da die Gefäßendothelien nun in hohem Maße Flt-1 exprimieren, und die Erhaltung und Überlebensfunktion von VEGF mit Flt-1 assoziiert ist (Fong et al. 1995), könnte dies bedeuten, dass von den Deziduazellen exprimiertes VEGF über den von den Gefäßendothelien exprimierten Flt-1 Rezeptor parakrin seine Wirkung vermitteln kann und so ein Aufrechterhalten der Endothelzellen bis zum Ende der Gravidität ermöglicht wird.

Eine weitere Aufgabe des VEGF Ligand-Rezeptor-Systems in Bezug auf die Deziduazellen könnte auch darin liegen, dass VEGF eine Rolle in der autokrinen/parakrinen Regulation des Wachstums und der Differenzierung der Deziduazellen während der Gravidität spielt. Dieses wurde auch als mögliche Funktion von VEGF in den Deziduazellen des Goldhamsters vermutet, bei dem ebenfalls eine Kolokalisation von VEGF, Flt-1 und KDR in den Deziduazellen festgestellt wurde (Yi et al. 1999). Auch in den humanen Deziduazellen wurde die Lokalisation von VEGF und Flt-1 beschrieben (Kumazaki et al. 2002; Sugino et al. 2002), und Sugino et al. (2002) beschrieben zudem die dortige Expression von KDR. Sie vermuteten, dass die hohe Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in dezidualisierten Zellen und Drüsenepithelzellen, und die Hochregulation von VEGF und KDR durch Östrogen und Progesteron darauf hinweist, dass VEGF in die Prolongation/Verlängerung der Lebensspanne von endometrialen Zellen für eine erfolgreiche Gestation involviert ist. Zudem wurde eine parakrine Wirkungsweise von VEGF aus den Deziduazellen auf die Flt-1 und KDR exprimierenden Gefäßendothelien vermutet, so dass deziduales VEGF zu der Formation eines dichten Gefäßnetzwerkes in der Dezidua beiträgt (Sugino et al. 2002). In der Plazenta des Rhesusaffen wurde ebenfalls KDR in den Deziduazellen nachgewiesen (Wei et al. 2004a; Wei et al. 2004b), VEGF dagegen wurde nur in geringem Maße von den dezidualisierten Stromazellen exprimiert (Ghosh et al. 2000). Die starke VEGF-Expression in den maternalen

Deziduazellen der Marmosetplazenta, einhergehend mit der starken Flt-1-Expression im invadierenden Trophoblasten, wurde als Hinweis angesehen, dass maternales VEGF, auf parakrinem Weg durch Bindung an den Flt-1-Rezeptor agierend, in die Regulation der Trophoblasteninvasion involviert ist (Wulff et al. 2002).

Eine weitere mögliche Funktion der Deziduazellen könnte, wie oben angeschnitten, in deren Beteiligung an der Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses liegen. Sowohl die Deziduazellen als auch die Periendothelzellen koexprimieren Aktin und Vimentin. Das kontraktile Potential dieser Zellen durch die Expression von Aktin zusammen mit der Tatsache, dass Vimentin als ein Intermediärfilament den Zellen und Geweben ihre mechanische Stabilität verleiht (Alberts et al. 2004), und die Vimentin-Synthese zudem bekanntlich mit Mobilität korreliert ist (Hay 1995), führt zu der Annahme, dass sich die Deziduazellen an der Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses beteiligen können. Hierfür spricht auch ihre Lokalisation im plazentaren Gewebe, denn sowohl die Deziduazellen als auch die Periendothelzellen befinden sich immer in unmittelbarer Nähe zu den plazentaren Gefäßen. Dementsprechend könnten sowohl die Deziduazellen als auch die Periendothelzellen eine wichtige Rolle während der Geburt spielen, indem sie ein Kontrahieren der Gefäße und eine Reduktion des Blutflusses verursachen (Walter und Schonkypl 2006). Denn im Gegensatz zu den Periendothelzellen des Nerzes, welche gegen Ende der Gravidität verschwinden (Winther et al. 1999b), bleiben sie in der caninen und felines Plazenta bis zum Ende der Gravidität bestehen.

Die Annahme einer Beteiligung an der Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses wurde auch für andere Tierarten und den Mensch getroffen. Wie bereits beschrieben, weisen die Periendothelzellen des Nerzes das gleiche Expressionsmuster auf wie der Hund, und auch bei dieser Tierart wurde aus oben genannten Gründen angenommen, dass die Periendothelzellen des Nerzes in die Regulation des fetoplazentaren Blutflusses involviert sind (Winther et al. 1999b). Auch die humanen dezidualen Vorläuferzellen sind um die Blutgefäße lokalisiert, und sie besitzen kontraktiles Potential durch die Expression von Aktin, was auch hier zu der Annahme führte, dass sie eine Rolle in der Regulation des Blutflusses spielen (Oliver et al. 1999; Kimatrai et al. 2003).

Es wurde bereits nachgewiesen, dass Deziduazellen zahlreiche Wachstumsfaktoren exprimieren. Beim Menschen wurde die Expression von TGF- β 1, PDGF-A und PDGF-B

sowie dessen Rezeptoren nachgewiesen (Kimatrai et al. 2003). Die Deziduazellen der Katzenplazenta exprimieren EGF, TGF, und den EGF-Rezeptor (Boomsma et al. 1997).

Wie sich in dieser Arbeit herausstellte, werden auch der Wachstumsfaktor VEGF sowie dessen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 in den Deziduazellen exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass die Deziduazellen über das VEGF-System in direkte angiogene Prozesse involviert sind. Auch ihre Lokalisation in unmittelbarer Nähe zu den maternalen plazentaren Gefäßen lässt auf eine Involvierung dieser Zellen in die plazentare Angiogenese schließen. Deziduazellen sind nicht nur im Plazentarlabrynth in Gefäßnähe lokalisiert, auch in der Invasionszone befinden sie sich in der Nähe der großen maternalen Arterien.

Die Einrichtung und Kontrolle des plazentaren Blutflusses ist wichtig für eine effiziente transplazentare Austauschfähigkeit zwischen Mutter und Fetus (Winther et al. 1999b), und die Deziduazellen könnten maßgeblich daran beteiligt sein.

Andere Autoren vermuteten, dass die Deziduazellen eine Rolle in der Limitierung der Trophoblasteninvasion und in der Bereitstellung von Nahrung für den invadierenden Trophoblasten spielen (Anderson 1969). Leiser und Koob (1993) vermuteten eine nutritive oder immunologische Funktion für die Deziduazellen. Goffin (2003) assoziierte die Deziduazellen ebenfalls mit limitierter Trophoblasteninvasion in Spezies mit hämochorialer Plazentation. In der endotheliochorialen Plazentation könnten die Deziduazellen durchaus eine Rolle in der Limitierung der Trophoblasteninvasion spielen.

Möglich wäre, dass den Deziduazellen und den Drüsenschichten in der caninen und felines Plazenta eine gemeinsame Aufgabe in Hinblick auf eine Limitierung der Trophoblasteninvasion zuzusprechen ist. Grether et al. (1998) vermuteten, dass die Drüsenkammern des Hundes das invasive Wachstum des Trophoblasten regulieren können. Bei den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass auch die Epithelien der Drüsenkammern sowie die Epithelien der tiefen Drüsenschicht des Hundes VEGF, Flt-1 und KDR exprimieren. Die Epithelien der Drüsen der Katze zeigten das gleiche Expressionsmuster. So kann man auch hier davon ausgehen, dass die Drüsenschichten nicht nur in direkte angiogene Prozesse involviert sind, sondern ebenfalls, wie die Deziduazellen, eine Rolle in der Limitierung der Trophoblasteninvasion spielen. Bei den Drüsenepithelien ist es nun so, dass sie schon zu Beginn der Gravidität eine starke immunhistochemische Reaktion für VEGF und dessen Rezeptoren zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen die Deziduazellen zu Beginn der Gravidität meist nur eine schwache Reaktion, die im Verlauf der Gravidität jedoch an Intensität zunimmt. Dies würde erklären, warum der Trophoblast zu Beginn der Trächtigkeit in seiner Invasion nicht beeinflusst wird, und wenn er gegen Ende der Gravidität

tief genug in das maternale Gewebe eingedrungen ist, durch die Deziduazellen sowie die Drüsenkammern und Drüsenschichten an einer weiteren Invasion in die tieferen maternalen Gewebe gehindert wird. Die schon zu Beginn der Plazentation starke Expression des VEGF-Systems in den Drüsenepithelien könnte das Wachstum des Trophoblasten schon von Anfang an daran hindern, in die Drüsenschichten einzudringen, doch die zunächst schwache Expression von VEGF und dessen Rezeptoren in den Deziduazellen erlaubt dem Trophoblasten noch das Eindringen in die maternalen Anteile des sich bildenden Plazentalabyrinths. Zudem könnten die Deziduazellen das Wachstum des Trophoblasten in die maternalen Gefäße verhindern, so dass dort zum einen die angiogenen Eigenschaften des VEGF-Systems zum Tragen kommen, durch den parakrinen Einfluss von VEGF aus den Deziduazellen auf die Flt-1 exprimierenden Endothelien der maternalen Gefäße, zum anderen könnte es die Invasion des Trophoblasten in die maternalen Gefäße verhindern, und diese so vor einer Zerstörung durch den Trophoblasten schützen. Auch für die Epithelzellen der Drüsen des Menschen wurde angenommen, dass sie eventuell eine wichtige Rolle in der Limitierung der Trophoblasteninvasion spielen, und dass sie durch ihre Proliferation in der frühen Gravidität eine Resistenz gegen die Trophoblasteninvasion repräsentieren (Demir et al. 2002).

Die Beteiligung der Dezidua an der Limitierung der Trophoblasteninvasion wurde für den Menschen bereits nachgewiesen. Xu et al. (2002) zeigten, dass die Proliferation, Migration und Invasivität von extravillösen Trophoblastzellen durch die zwei dezidualen Produkte TGF- β und Decorin negativ reguliert werden. Die Dezidua übt also über TGF- β und Decorin antiproliferative, antimigratorische und antiinvasive Effekte aus (Xu et al. 2002). Die proliferativen, migrativen und invasiven Funktionen der extravillösen Trophoblastzellen werden in situ auf eine autokrine/parakrine Art und Weise streng reguliert, und zwar durch eine Vielzahl von Faktoren im Mikromilieu der extravillösen Trophoblastzellen, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktoren-bindende Proteine und Proteoglycane, sowie durch Komponenten der Extrazellulären Matrix (Xu et al. 2002). Im Falle der caninen und felines Plazenta könnte einer dieser Wachstumsfaktoren VEGF sein, der parakrin auf den Trophoblasten einwirkt, welcher die Rezeptoren Flt-1 und KDR exprimiert, durch die die antiproliferativen, antimigratorischen und antiinvasiven Effekte auf den Trophoblasten vermittelt werden könnten.

Auch Goffin et al. (2003) vertreten die Hypothese, dass die Dezidualisation als eine endometriale Barriere angesehen wird, die die Trophoblasteninvasion limitiert und den Uterus vor irreversibler Schädigung als ein Resultat der exzessiven hämochorialen Plazentation

schützt. Er schreibt, dass das übermäßige Wachstum des Trophoblasten, das in der Abwesenheit von Dezidua in IL-11R Knockout-Mäusen stattfindet, die Hypothese unterstützt, dass die Dezidua eine Rolle bei der Einschränkung der Trophoblasteninvasion spielt, und dass deziduales Gewebe als eine Barriere für exzessive Trophoblasteninvasion agiert.

Ebenso wurde nachgewiesen, dass der Transfer von Maus-Blastozysten zu ektopischen, nicht-dezidualisierten weichen Geweben in einer extensiveren Trophoblasteninvasion als die im Uterus beobachtete resultiert (Bevilacqua und Abrahamsohn 1994).

Als weiterführende Untersuchungen für die Rolle der Deziduazellen und Periendothelzellen der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze im Hinblick auf die Kontrolle der Trophoblasteninvasion könnte man diese ebenfalls auf negativ regulierende Faktoren wie TGF- β und Decorin in der Zellkultur untersuchen. Immunhistochemisch wurden die Deziduazellen der Katze bereits auf TGF untersucht, und es stellte sich heraus, dass sie TGF exprimieren (Boomsma et al. 1997), so dass theoretisch von einer negativen Regulation der Trophoblasteninvasion durch die Deziduazellen ausgegangen werden kann. Es wäre jedoch interessant zu untersuchen, ob dieses durch definitive Versuche in der Zellkultur bestätigt werden könnte.

4.4 Bedeutung von VEGF und seinen Rezeptoren in der caninen und felines Plazenta

Die endotheliochoriale Plazenta von Hund und Katze ist durch ein kontinuierliches Fortschreiten der Trophoblasteninvasion bis zum Ende der Gravidität charakterisiert. Um die Rolle des VEGF-Systems in der Plazentation und der Trophoblasteninvasion und -funktion aufzudecken, wurden VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 in den unterschiedlichen Zelltypen der caninen und felines Plazenta über die gesamte Gravidität hin untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass VEGF und seine Rezeptoren nicht nur in Zellen exprimiert werden, die essentiell für das Stattfinden angiogener Prozesse sind, wie maternale und fetale Endothelzellen und Mesenchymzellen, sondern auch in anderen Zellpopulationen. So wurden im Trophoblasten über die gesamte Gravidität hin VEGF, Flt-1 und KDR detektiert. Dieses Expressionsmuster des VEGF Ligand-Rezeptor-Systems deutet darauf hin, dass VEGF nicht nur in die Regulation der plazentaren Angiogenese involviert ist, sondern auch in die Regulation der Trophoblasteninvasion. Auch die Deziduazellen scheinen aufgrund der

Expression von VEGF und seinen Rezeptoren sowohl in die Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses wie auch in die Kontrolle der Trophoblastenfunktion involviert zu sein; und obwohl die Funktion der maternalen Deziduazellen bislang unbekannt ist, befinden sie sich in einer strategischen Position, um die Trophoblastenfunktion zu kontrollieren und an der Regulation des plazentaren Blutflusses teilzuhaben.

Das VEGF Ligand-Rezeptor-System scheint also nicht nur die Gefäßentwicklung und Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität während der Plazentation zu regulieren, sondern auch als Wachstumsfaktor für Wachstums- und Differenzierungsprozesse wie die Trophoblasteninvasion und die Drüsenentwicklung zu agieren. Die Bedeutung von VEGF scheint also in verschiedenen, die Plazentation regulierenden, Eigenschaften zu liegen, denn die endotheliochoriale Plazentation ist abhängig von der Etablierung und Aufrechterhaltung eines kompetenten Gefäßnetzwerks sowie der Trophoblasteninvasion und -Differenzierung.

5 Zusammenfassung

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist einer der Hauptwachstumsfaktoren in Bezug auf die Angiogenese. Diese spielt für die plazentare Entwicklung und Morphogenese eine entscheidende Rolle, denn Plazentagewebe zeigt ein hohes Ausmaß an Angiogenese, ein Prozess, der für Gewebewachstum und Plazentamorphologie verantwortlich ist.

Diese Arbeit befasste sich daher mit der räumlichen und zeitlichen Expression von VEGF und seinen beiden Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und Flk-1 (KDR, VEGFR-2) in der endotheliochorialen caninen und felines Plazenta. Sie sollte über den Zusammenhang von Vaskularisierung, VEGF-Expression und dessen Rolle in der plazentaren Angiogenese der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze Aufschluss geben. Von besonderem Interesse waren weiterhin das Invasionsverhalten der Trophoblastzellen und die Charakterisierung der Deziduazellen. Initial erfolgte eine Identifikation der Gewebekomponenten innerhalb der Plazenta durch die Analyse der Expression der zytoskeletalen Filamente α -sm-Actin, Vimentin und Zytokeratin.

Der Nachweis von VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 in der caninen und felines Plazenta erfolgte auf Protein- und mRNA-Ebene. Auf Proteinebene wurden die Immunhistochemie und der Western Blot eingesetzt, auf mRNA-Ebene die RT-PCR, Real Time RT-PCR und für VEGF zusätzlich die In situ Hybridisierung. Die untersuchten Plazenten stammen von insgesamt 23 Katzen und 43 Hunden und wurden im Rahmen von Kastrationen gesunder, trächtiger Tiere entnommen. Das Material wurde in Formalin fixiert und schockgefroren beziehungsweise in RNAlater® überführt. Das Probenmaterial deckte den gesamten Zeitraum der Trächtigkeit ab, von der frühen Gravidität bis unmittelbar vor den Geburtseintritt.

Die drei eingesetzten Antikörper gegen die Zytoskelettfilamente (α -sm Actin, Vimentin und Zytokeratin) zeigten im Verlauf der Trächtigkeit keine Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Expression. Die generelle Verteilung von α -sm Actin, Vimentin und Zytokeratin änderte sich also im Verlauf der Gravidität nicht. Zytokeratin wurde vor allem zur Identifikation der invadierenden Trophoblastzellen eingesetzt und war dementsprechend in den Trophoblastzellen sowie im Epithel der Drüsen lokalisiert. α -sm Actin konnte im Myometrium, in den Endothelzellen der fetalen Kapillaren und in maternalen Gefäßwänden sowie in den Deziduazellen und Periendothelzellen nachgewiesen werden. Vimentin färbte

das fetale und maternale Gefäßendothel sowie die Periendothelzellen beziehungsweise die Deziduazellen mit hoher Intensität.

VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 konnten während der gesamten Gravidität in der caninen und felines Plazenta detektiert werden. Dabei zeigte die immunhistochemische Färbung eine annähernd identische räumlich-zeitliche Verteilung von VEGF, Flt-1 und KDR. Das komplette VEGF Ligand-Rezeptor-System konnte auf maternaler Seite im Myometrium, in den Drüsenepithelien und in den Deziduazellen nachgewiesen werden, auf fetaler Seite in den Trophoblastzellen sowie in den fetalen Kapillaren und Mesenchymzellen. Die Endothelzellen der maternalen Gefäße zeigten eine deutliche Immunreaktion für VEGF und besonders für Flt-1, wohingegen KDR in den maternalen Gefäßen des Plazentalabyrinths meist keine Immunreaktion hervorrief, dafür aber in den Endothelien der großen maternalen Arterien in der Invasionszone.

Sowohl im Plazentahomogenat der Katze als auch in dem des Hundes konnten VEGF und seine Rezeptoren mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Auch auf der mRNA-Ebene konnten VEGF, Flt-1 und KDR in jedem untersuchten Trächtigkeitsstadium ermittelt werden. Bei der Real Time RT-PCR stellte sich heraus, dass das Expressionsniveau von VEGF in der frühen Gravidität am höchsten war und bis zum Ende der Gravidität kontinuierlich sank. Die Expression von Flt-1 fand in den ersten beiden Graviditätsdritteln auf eher niedrigem Niveau statt und stieg dann am Ende der Gravidität hoch-signifikant ($p=0,0014$) an. Die Flk-1 mRNA-Expression dagegen war in den frühen Stadien der Gravidität und am Ende der Gravidität niedrig, mit einem signifikanten Anstieg ($p\leq 0,05$) in der Gestationsmitte.

Für VEGF wurde bei der In situ Hybridisierung sowohl auf maternaler als auch auf fetaler Seite ein der IHC entsprechendes Expressionsmuster der VEGF-mRNA festgestellt.

Somit konnten VEGF und seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 in dieser Studie erstmalig erfolgreich in der endotheliochorialen Plazenta von Hund und Katze nachgewiesen werden. Die Lokalisation von VEGF in den Endothelien der plazentaren Gefäße sowie in den fetalen Mesenchymzellen spiegelt die Involvierung von VEGF in direkte angiogene Prozesse während der Plazentation von Hund und Katze wieder. Die Expression von VEGF in nicht-endothelialen Zellpopulationen wie dem Trophoblasten deutet darauf hin, dass VEGF zudem autokrin die Trophoblastenfunktion beeinflussen kann oder parakrin auf benachbarte Zellen einwirken kann. Die Anwesenheit von VEGF in den Deziduazellen und Periendothelzellen

sowie deren Lokalisation im Gewebe lässt den Schluss zu, dass sie in die Regulation des lokalen plazentaren Blutflusses und zudem in die Kontrolle der Trophoblasteninvasion involviert sind. Des weiteren könnte VEGF eine Rolle in der Entwicklung und Differenzierung der Deziduazellen spielen.

Abschließend kann also davon ausgegangen werden, dass das VEGF Ligand-Rezeptor-System in der Regulation der caninen und felines Plazentation partizipiert und zusätzlich zu seinen angiogenen Eigenschaften beeinflusst es vielleicht die Zelldifferenzierung und Sekretionseigenschaften im Drüsenepithel sowie die Zelldifferenzierung und Invasionseigenschaften des Trophoblasten.

6 Summary

Vascular endothelial growth factor (VEGF) represents one of the major growth factors in reference to angiogenesis. The high degree of angiogenesis in placental tissues plays an essential role for placental development and morphogenesis.

The placental neovascularization is a physiological process which is characterized by an initial dramatic increase of blood vessels through angiogenesis (the development of new blood vessels from pre-existing vessels) on the maternal site and vasculogenesis (de novo formation of new capillaries from the embryonic mesenchyme) on the fetal site. Therefore this study was conferred with the spatiotemporal expression of VEGF and its two receptors Flt-1 (VEGFR-1) and Flk-1 (KDR, VEGFR-2) in the canine and feline placenta. The aim of the study was to gain further insight into the relation of vascularization, VEGF-expression and its role in the placental angiogenesis in the endotheliochorial placenta of dog and cat. Furthermore the invasive behaviour of the trophoblast and the characterization of the decidual cells have been of special interest.

The first target of this research was the identification of the tissue components within the placenta. Therefore we analyzed the expression of the micro- and intermediate filaments α -sm actin, cytokeratin and vimentin.

The detection of VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in the canine and feline placenta occurred on protein and mRNA levels. Protein was analyzed by immunohistochemistry and western blot, mRNA was analyzed by RT-PCR, Real Time RT-PCR and in situ hybridization. The examined placentas were taken from 23 cats and 43 dogs, through castrations of healthy, pregnant animals. The material was fixed in formalin and shock-frozen in liquid nitrogen or transferred in RNAlater®. The tissue samples covered the whole period of gestation, from early gestation to immediately prepartum.

The three antibodies against the cytoskeletal filaments α -sm actin, cytokeratin and vimentin showed no differences in the spatiotemporal expression throughout pregnancy. So the general distribution of α -sm actin, cytokeratin and vimentin have presented no change in the course of gestation. Cytokeratin was used to identify the invading trophoblast and was therefore localized in the trophoblast cells and in the epithelial cells of the glands. α -sm actin was detected in the myometrium, the endothelial cells of the fetal capillaries, in the maternal vessel walls and in the decidual cells and periendothelial cells. Vimentin stained the fetal and

maternal endothelium and the decidual cells or respectively periendothelial cells with high intensity.

VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 could be detected in the canine and feline placenta throughout the whole period of gestation. Thereby the immunohistochemical staining showed an approximately identical spatiotemporal distribution for VEGF, Flt-1 and KDR. On the maternal site the whole VEGF ligand-receptor-system could be detected in the myometrium, the epithelial cells of the glands and in the decidual cells. On the fetal site it was localized in the trophoblast cells as well as in fetal capillaries and mesenchymal cells. Whereas the endothelial cells of the maternal vessels showed a distinct immunoreactivity for VEGF and especially for Flt-1, KDR did not evoke an immunoreactivity in the maternal vessels of the placental labyrinth, but in the endothelium of the big maternal arteries in the invasive zone.

To verify the results of the immunohistochemistry, a western blot was accomplished on protein level. VEGF and its receptors could be detected in the feline placental homogenate as well as in the canine placental homogenate.

Item on mRNA level VEGF, Flt-1 and KDR could be acquired in each of the examined gestational stages. The Real Time RT-PCR showed that the expression of VEGF was highest in early gestation and decreased continuously until term. The expression of Flt-1 was on a low level in the first and second gestational trimester and increased very significant ($p=0,0014$) at the end of gestation. In contrast, the KDR mRNA-expression was low in the early stages of gestation and near term, with a significant increase ($p\leq 0,05$) in the mid gestation.

The in situ hybridization displayed an expression pattern for VEGF accordingly to that of the immunohistochemistry, both on the maternal and the fetal site.

As result of this study, VEGF and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 could be detected successfully in the endotheliochorial placenta of dog and cat for the first time. The localization of VEGF in the endothelial cells of the placental vessels as well as in fetal mesenchymal cells, reflected the involvement of VEGF in direct angiogenic processes during the placentation of dog and cat. The expression of VEGF in non-endothelial cell populations like the trophoblast, indicates that the VEGF system may influence trophoblast function in an autocrine manner or act on neighbouring cells in a paracrine manner. The presence of VEGF in decidual cells or periendothelial cells as well as their localization in the tissue, suggest that they are involved in the regulation of local placental blood flow and in the control of

trophoblast invasion. Furthermore, VEGF could play a role in the development and differentiation of decidual cells.

In conclusion, we assume that the VEGF ligand-receptor-system participates in the regulation of canine and feline placentation, and in addition to its angiogenic properties it may influence cell differentiation and secretion properties in the gland epithelium as well as in cell differentiation and invasion properties in the trophoblast.

7 Literaturverzeichnis

1. Abrahamsohn PA, Zorn TM (1993) Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266:603-628
2. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:548-553
3. Ahmed A, Dunk C, Kniss D, Wilkes M (1997) Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab Invest* 76:779-791
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) Das Cytoskelett. In: *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 1055-1140
5. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1:1024-1028
6. Amoroso EC (1952) Placentation. In: Parkes AS (ed.) *Marshall's physiology of reproduction*. Longmans Green, London, pp 127-316
7. Anderson JW (1969) Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog. I. The placental labyrinth. *Anat Rec* 165:15-35
8. Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK (1998) Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 59:643-654
9. Badwaik NK, Rasweiler JJ, Muradali F (1998) Co-expression of cytokeratins and vimentin by highly invasive trophoblast in the white-winged vampire bat, *Diaemus youngi*, and the black mastiff bat, *Molossus ater*, with observations on intermediate filament proteins in the decidua and intraplacental trophoblast. *J Reprod Fertil* 114:307-325
10. Banks RE, Forbes MA, Searles J, Pappin D, Canas B, Rahman D, Kaufmann S, Walters CE, Jackson A, Eves P, Linton G, Keen J, Walker JJ, Selby PJ (1998) Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1. *Mol Hum Reprod* 4:377-386
11. Barleon B, Hauser S, Schollmann C, Weindel K, Marme D, Yayon A, Weich HA (1994) Differential expression of the two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells. *J Cell Biochem* 54:56-66

12. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343
13. Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G (1997) Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J Biol Chem* 272:10382-10388
14. Barrau MD, Abel JH, Torbit CA, Tietz WJ (1975) Development of the implantation chamber in the pregnant bitch. *Am J Anat* 143:115-130
15. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125:1591-1598
16. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R (2000) Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 167:371-382
17. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG (1999) Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274:31047-31054
18. Bevilacqua E, Abrahamsohn PA (1994) Invasiveness of mouse trophoblastic cells in connective tissue. *Acta Anat (Basel)* 150:246-252
19. Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP (1998) The impact of either a Meishan or Yorkshire uterus on Meishan or Yorkshire fetal and placental development to days 70, 90, and 110 of gestation. *J Anim Sci* 76:2169-2176
20. Bischof P, Meisser A, Campana A (2000) Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review. *Placenta* 21 Suppl A:S55-S60
21. Bischof P, Meisser A, Campana A (2001) Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Ann N Y Acad Sci* 943:157-162
22. Björkman N (1957) A histological study of the foetal-maternal relationship in the paraplacenta of the cat. *Acta morph neerl scand* 203-208
23. Björkman N (1970) An atlas of placental fine structure, Baillière Tindall & Cassell, London
24. Björkman N, Dantzer V, Leiser R (1989) Comparative placentation in laboratory animals- A review. *Scand J Lab Anim Sci* 16:129-158
25. Blankenship TN, Enders AC, King BF (1993a) Trophoblastic invasion and modification of uterine veins during placental development in macaques. *Cell Tissue Res* 274:135-144
26. Blankenship TN, Enders AC, King BF (1993b) Trophoblastic invasion and the development of uteroplacental arteries in the macaque: immunohistochemical

localization of cytokeratins, desmin, type IV collagen, laminin, and fibronectin. *Cell Tissue Res* 272:227-236

27. Blankenship TN, King BF (1993) Developmental changes in the cell columns and trophoblastic shell of the macaque placenta: an immunohistochemical study localizing type IV collagen, laminin, fibronectin and cytokeratins. *Cell Tissue Res* 274:457-466
28. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY (2001) Developmental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and VEGF binding in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 22:265-275
29. Boomsma RA, Mavrogianis PA, Verhage HG (1991) Changes in endometrial and placental protein synthesis and morphology during pregnancy and pseudopregnancy in the cat. *Biol Reprod* 44:345-356
30. Boomsma RA, Mavrogianis PA, Verhage HG (1997) Immunocytochemical localization of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the cat endometrium and placenta. *Histochem J* 29:495-504
31. Bradbury FM, Ockleford CD (1990) A confocal and conventional epifluorescence microscope study of the intermediate filaments in chorionic villi. *J Anat* 169:173-187
32. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W (1992) Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114:521-532
33. Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W (1997) Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost* 78:678-683
34. Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, Ahmed A (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* 159:993-1008
35. Caluwaerts S, Vercruysse L, Luyten C, Pijnenborg R (2005) Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta* 26:574-584
36. Can A, Tekelioglu M, Baltaci A (1995) Expression of desmin and vimentin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. *Placenta* 16:261-275
37. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML (1996) Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 271:3154-3162
38. Carmeliet P, Collen D (1999) Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:133-158
39. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D,

- Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439
40. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT (1999) Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5:495-502
 41. Carter AM, Tanswell B, Thompson K, Han VK (1998) Immunohistochemical identification of epithelial and mesenchymal cell types in the chorioallantoic and yolk sac placentae of the guinea-pig. *Placenta* 19:489-500
 42. Cavaille F, Kacemi A, Mondon F, Fournier T, Ferre F (1995) Contractile proteins in human fetoplacental vessels. *Am J Obstet Gynecol* 173:1793-1799
 43. Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun ET, Savas B, Demir R (2004) Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol Reprod Dev* 67:414-423
 44. Charnock-Jones D (2002) Soluble flt and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. *J Anat* 200:527
 45. Charnock-Jones DS, Clark DE, Licence D, Day K, Wooding FB, Smith SK (2001) Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction* 122:753-760
 46. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, Smith SK (1994) Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 51:524-530
 47. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boock CA, Smith SK (1993) Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 48:1120-1128
 48. Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP (1998) Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol* 29:910-914
 49. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
 50. Chou YH, Skalli O, Goldman RD (1997) Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Curr Opin Cell Biol* 9:49-53
 51. Christinger HW, Muller YA, Berleau LT, Keyt BA, Cunningham BC, Ferrara N, de Vos AM (1996) Crystallization of the receptor binding domain of vascular endothelial growth factor. *Proteins* 26:353-357
 52. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS (1998a) A vascular endothelial growth factor antagonist is

produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 59:1540-1548

53. Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AL, Charnock-Jones DS (1998b) Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 159:459-467
54. Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS (1996) Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod* 11:1090-1098
55. Clausen HV, Larsen LG, Carter AM (2003) Vascular reactivity of the preplacental vasculature in Guinea pigs. *Placenta* 24:686-697
56. Clauss M (1998) Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *Trends Cardiovasc Med* 8:241-245
57. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W (1996) The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 271:17629-17634
58. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J (1989) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 264:20017-20024
59. Cooper JC, Sharkey AM, McLaren J, Charnock-Jones DS, Smith SK (1995) Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J Reprod Fertil* 105:205-213
60. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32:219-229
61. Cunningham SA, Tran TM, Arrate MP, Brock TA (1999) Characterization of vascular endothelial cell growth factor interactions with the kinase insert domain-containing receptor tyrosine kinase. A real time kinetic study. *J Biol Chem* 274:18421-18427
62. Dantzer V, Leach L, Leiser R (2000) Angiogenesis and placental vasculature--a workshop report. *Placenta* 21 Suppl A:S69-S70
63. Dantzer V, Leiser R, Kaufmann P, Luckhardt M (1988) Comparative morphological aspects of placental vascularization. In: *Trophoblast Research*. Plenum Press, New York, pp 235-260
64. Das SK, Chakraborty I, Wang J, Dey SK, Hoffman LH (1997) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor messenger ribonucleic acids in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 56:1390-1399

65. Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N (1996) The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J* 15:4919-4927
66. Davis-Smyth T, Presta LG, Ferrara N (1998) Mapping the charged residues in the second immunoglobulin-like domain of the vascular endothelial growth factor/placenta growth factor receptor Flt-1 required for binding and structural stability. *J Biol Chem* 273:3216-3222
67. Daya D, Sabet L (1991) The use of cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastic tissue. *Am J Clin Pathol* 95:137-141
68. de Souza PC, Katz SG (2001) Coexpression of cytokeratin and vimentin in mice trophoblastic giant cells. *Tissue Cell* 33:40-45
69. Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B (2006) Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta* 27:535-539
70. Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Arici A (2002) Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta* 23:672-684
71. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, Huppertz B (2004) Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 25:560-572
72. Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P (1997) Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech* 38:29-41
73. Denker HW, Eng LA, Mootz U, Hamner CE (1978) Studies on the early development and implantation in the cat: 1. Cleavage and blastocyst formation. *Anat Anz* 144:457-468
74. Eichmann A, Corbel C, Jaffredo T, Breant C, Joukov V, Kumar V, Alitalo K, Le Douarin NM (1998) Avian VEGF-C: cloning, embryonic expression pattern and stimulation of the differentiation of VEGFR2-expressing endothelial cell precursors. *Development* 125:743-752
75. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Breant C, Le Douarin NM (1997) Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5141-5146
76. Enders AC, Blankenship TN (1997) Modification of endometrial arteries during invasion by cytotrophoblast cells in the pregnant macaque. *Acta Anat (Basel)* 159:169-193

77. Ergun S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK (1997) Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 131:9-20
78. Faulk WP, Labarrere CA, Carson SD (1990) Tissue factor: identification and characterization of cell types in human placentae. *Blood* 76:86-96
79. Ferrara N (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1358-C1366
80. Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581-611
81. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442
82. Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25
83. Ferrara N, Gerber HP (2001) The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 106:148-156
84. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858
85. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13:18-32
86. Ferrara N, Winer J, Burton T, Rowland A, Siegel M, Phillips HS, Terrell T, Keller GA, Levinson AD (1993) Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells. *J Clin Invest* 91:160-170
87. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376:66-70
88. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J (1999) Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development* 126:3015-3025
89. Fuchs E, Weber K (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63:345-382
90. Galabova-Kovacs G, Walter I, Aurich C, Aurich JE (2004) Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. *Theriogenology* 61:963-976
91. Gargett CE, Bucak K, Rogers PA (2000) Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 15:293-301

92. Gellersen B, Brosens J (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* 178:357-372
93. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N (1998a) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273:13313-13316
94. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998b) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273:30336-30343
95. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB (2002) Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4213-4224
96. Ghosh D, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Dhawan L, Dhara S, Smith SK, Sengupta J (2000) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. *Mol Hum Reprod* 6:935-941
97. Glasser SR, Julian J (1986a) Intermediate filament protein as a marker of uterine stromal cell decidualization. *Biol Reprod* 35:463-474
98. Glasser SR, Julian J (1986b) Intermediate filaments of the midgestation rat trophoblast giant cell. *Dev Biol* 113:356-363
99. Goffin F, Munaut C, Malassine A, Evain-Brion D, Frankenne F, Fridman V, Dubois M, Uzan S, Merviel P, Foidart JM (2003) Evidence of a limited contribution of feto-maternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway. *Tissue Antigens* 62:104-116
100. Grether BM, Friess AE, Stoffel MH (1998) The glandular chambers of the placenta of the bitch in the second third of pregnancy (day 30-44): an ultrastructural, ultrahistochemical and lectinhistochemical investigation. *Anat Histol Embryol* 27:95-103
101. Grosser O (1909) Die Placentation. In: *Vergleichende Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Eihäute und der Placenta mit besonderer Berücksichtigung des Menschen*. Wilhelm Braumüller, Wien, Leipzig, pp 118-133
102. Grosser O (1927) Vergleichende Placentationslehre. In: *Frühentwicklung Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere*. Verlag von J.F. Bergmann, München, pp 110-121
103. Haigh T, Chen C, Jones CJ, Aplin JD (1999) Studies of mesenchymal cells from 1st trimester human placenta: expression of cytokeratin outside the trophoblast lineage. *Placenta* 20:615-625
104. Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277:48-50

105. Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364
106. Hansen-Algenstaedt N, Algenstaedt P, Bottcher A, Joscheck C, Schwarzloh B, Schaefer C, Muller I, Koike C, Ruther W, Fink B (2003) Bilaterally increased VEGF-levels in muscles during experimental unilateral callus distraction. *J Orthop Res* 21:805-812
107. Harrison-Woolrych ML, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Smith SK (1995) Localization and quantification of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in human myometrium and leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1853-1858
108. Hay ED (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154:8-20
109. He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS (1999) Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 13:537-545
110. Helske S, Vuorela P, Carpen O, Hornig C, Weich H, Halmesmaki E (2001) Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod* 7:205-210
111. Hildebrandt VA, Babischkin JS, Koos RD, Pepe GJ, Albrecht ED (2001) Developmental regulation of vascular endothelial growth/permeability factor messenger ribonucleic acid levels in and vascularization of the villous placenta during baboon pregnancy. *Endocrinology* 142:2050-2057
112. Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME (2000) Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 63:1787-1794
113. Hornig C, Weich HA (1999) Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 3:33-39
114. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580
115. Huynh-Do U (2006) Angiogenese und Antiangiogenese: die zwei Gesichter der Gefäßneubildung. *Schweiz Med Forum* 6:763-768
116. Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N (1993) Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 133:848-859
117. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N (1992) Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89:244-253

118. Janssen, A. Ueber die Plazenta und Paraplazenta bei der Katze. 1-65. 1933.
Hannover.
Ref Type: Thesis/Dissertation
119. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15:1751
120. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3566-3570
121. Kappel A, Ronicke V, Damert A, Flamme I, Risau W, Breier G (1999) Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood* 93:4284-4292
122. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5:74-80
123. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246:1309-1312
124. Kehrler A (1973) Zur Entwicklung und Ausbildung des Chorions der Placenta Zonaria bei Katze, Hund und Fuchs. *Z Anat Entwickl Gesch* 143:25-42
125. Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10705-10709
126. Kendall RL, Wang G, Thomas KA (1996) Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 226:324-328
127. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N (1996a) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271:7788-7795
128. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N (1996b) Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 271:5638-5646
129. Khong TY, Lane EB, Robertson WB (1986) An immunocytochemical study of fetal cells at the maternal-placental interface using monoclonal antibodies to keratins, vimentin and desmin. *Cell Tissue Res* 246:189-195

130. Kimatrai M, Oliver C, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Olivares EG (2003) Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:844-849
131. Klagsbrun M, D'Amore PA (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:259-270
132. Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Huppertz B, Fischer B (1999a) Nucleic acid sequence of feline preprorelaxin and its localization within the feline placenta. *Biol Reprod* 60:305-311
133. Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Froehlich C, Kauffold J, Steger K, Steinetz BG, Fischer B (1999b) Canine preprorelaxin: nucleic acid sequence and localization within the canine placenta. *Biol Reprod* 60:551-557
134. Konoplev SN, Dimashkieh HH, Stanek J (2004) Cytokeratin immunohistochemistry: a procedure for exclusion of pregnancy in chorionic villi-negative specimen. *Placenta* 25:146-152
135. Krebs C, Winther H, Dantzer V, Leiser R (1997) Vascular interrelationships of near-term mink placenta: light microscopy combined with scanning electron microscopy of corrosion casts. *Microsc Res Tech* 38:125-136
136. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y (2002) Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol* 33:1069-1077
137. Kunath T, Strumpf D, Rossant J (2004) Early trophoblast determination and stem cell maintenance in the mouse--a review. *Placenta* 25 Suppl A:S32-S38
138. Labarrere CA, Faulk WP (1994) Antigenic identification of cells in spiral artery trophoblastic invasion: validation of histologic studies by triple-antibody immunocytochemistry. *Am J Obstet Gynecol* 171:165-171
139. Lash GE, Cartwright JE, Whitley GS, Trew AJ, Baker PN (1999) The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility. *Placenta* 20:661-667
140. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1988-1992
141. Leiser I, Kohler T (1983) The blood vessels of the cat girdle placenta. Observations on corrosion casts, scanning electron microscopical and histological studies. I. Maternal vasculature. *Anat Embryol (Berl)* 167:85-93
142. Leiser R (1979) [Blastocyst implantation in the domestic cat. Light and electron microscopic study]. *Anat Histol Embryol* 8:79-96
143. Leiser R (1981) *Human Reproduction*, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton

144. Leiser R (1982) Development of the trophoblast in the early carnivore placenta of the cat. *Bibl Anat* 93:107
145. Leiser R, Dantzer V, Kaufmann P (1989) Combined microcorrosion casts of maternal and fetal placental vasculature. A new method of characterizing different placental types. *Prog Clin Biol Res* 296:421-433
146. Leiser R, Enders AC (1980a) Light- and electron-microscopic study of the near-term paraplacenta of the domestic cat. I. Polar zone and paraplacental junctional areas. *Acta Anat (Basel)* 106:293-311
147. Leiser R, Enders AC (1980b) Light- and electron-microscopic study of the near-term paraplacenta of the domestic cat. II. Paraplacental hematoma. *Acta Anat (Basel)* 106:312-326
148. Leiser R, Kaufmann P (1994) Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* 102:122-134
149. Leiser R, Koob B (1992) Structural and functional aspects of placental microvasculature studied from corrosion casts. In: Motta PM, Murakami T, Fujita H (eds) *Scanning Electron Microscopy of Vascular Casts: Methods and Applications*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp 261-277
150. Leiser R, Koob B (1993) Development and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat. *J Exp Zool* 266:642-656
151. Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ (1994) *In situ-Hybridisierung aus der Reihe : Labor im Fokus*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford
152. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309
153. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271:2746-2753
154. Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y (2005) Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 26:210-217
155. Liebich H-G (1999) Zytologie, die Lehre von der Zelle. In: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Schattauer, Stuttgart, pp 1-34
156. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001a) Das Actincytoskelett. In: *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, pp 814-823
157. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001b) Intermediärfilamente. In: *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, pp 903-916

158. Lopes FL, Desmarais J, Gevry NY, Ledoux S, Murphy BD (2003) Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and receptors Flt-1 and KDR during the peri-implantation period in the mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod* 68:1926-1933
159. Ma W, Tan J, Matsumoto H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK, Dey SK (2001) Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol* 15:1983-1992
160. Mac GF, Popel AS (2004) Model of competitive binding of vascular endothelial growth factor and placental growth factor to VEGF receptors on endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H153-H164
161. Malassine A (1982) Scanning and transmission electron-microscopic observations of the 'hemophagous organ' of the cat placenta. *Bibl Anat* 108-116
162. Matsumoto H, Ma WG, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, Trzaskos JM, Dey SK (2002) Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem* 277:29260-29267
163. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR (1991) A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9026-9030
164. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 18:363-374
165. Miglino MA, Carter AM, Ambrosio CE, Bonatelli M, De Oliveira MF, Dos Santos Ferraz RH, Rodrigues RF, Santos TC (2004) Vascular organization of the hystricomorph placenta: a comparative study in the agouti, capybara, guinea pig, paca and rock cavy. *Placenta* 25:438-448
166. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24
167. Morishita K, Johnson DE, Williams LT (1995) A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem* 270:27948-27953
168. Mossman HW (1987) Vertebrate fetal membranes: Comparative ontogeny and morphology; Evolution; Phylogenetic significance: Basic functions; Research opportunities, The Macmillan Press Ltd., Houndmills, Basingstoke, Hampshire and London
169. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, de Vos AM (1997) The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* 5:1325-1338

170. Mustonen T, Alitalo K (1995) Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* 129:895-898
171. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13:9-22
172. Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M (1994) Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 145:1023-1029
173. Nie G, Li Y, Salamonsen LA (2005) Serine protease HtrA1 is developmentally regulated in trophoblast and uterine decidual cells during placental formation in the mouse. *Dev Dyn* 233:1102-1109
174. Norrby K (1997) Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105:417-437
175. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285
176. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG (1999) Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod* 14:1599-1605
177. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K (1999) Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 10:528-535
178. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U (1998) Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11709-11714
179. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U (1996a) Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2576-2581
180. Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U (1996b) Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 271:19310-19317
181. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N (1994) Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 269:25646-25654
182. Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4:1317-1326
183. Patterson C, Perrella MA, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E (1995) Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 270:23111-23118

184. Pepper MS (1997) Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:605-619
185. Persson E, Rodriguez-Martinez H (1997) Immunocytochemical localization of growth factors and intermediate filaments during the establishment of the porcine placenta. *Microsc Res Tech* 38:165-175
186. Peters KG, De Vries C, Williams LT (1993) Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8915-8919
187. Pfarrer CD (2006) Characterization of the bovine placenta by cytoskeleton, integrin receptors, and extracellular matrix. *Methods Mol Med* 121:323-335
188. Pfarrer CD, Ruziwa SD, Winther H, Callesen H, Leiser R, Schams D, Dantzer V (2006) Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term. *Placenta* 27:889-898
189. Plate K (2001) From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nat Med* 7:151-152
190. Poncelet C, Fauvet R, Feldmann G, Walker F, Madelenat P, Darai E (2004) Prognostic value of von Willebrand factor, CD34, CD31, and vascular endothelial growth factor expression in women with uterine leiomyosarcomas. *J Surg Oncol* 86:84-90
191. Potgens AJ, Gaus G, Frank HG, Kaufmann P (2001) Characterization of trophoblast cell isolations by a modified flow cytometry assay. *Placenta* 22:251-255
192. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7533-7537
193. Rasweiler JJ, Badwaik NK, Sugarbaker TA (2000) Unusual patterns of intermediate filament protein expression by the trophoblast and decidual cells of the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*. *Placenta* 21:853-869
194. Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP (2001) Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 65:879-889
195. Regnault TR, Orbus RJ, de Vrijer B, Davidsen ML, Galan HL, Wilkening RB, Anthony RV (2002) Placental expression of VEGF, PlGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* 23:132-144
196. Reynolds LP, Kirsch JD, Kraft KC, Redmer DA (1998) Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. *Biol Reprod* 59:613-620
197. Reynolds LP, Redmer DA (2001) Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 64:1033-1040

198. Ribatti D (2005) The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 128:303-309
199. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
200. Roberts WG, Palade GE (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 108 (Pt 6):2369-2379
201. Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM (2003) Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 126:227-238
202. Ruther U, Koenen M, Otto K, Muller-Hill B (1981) pUR222, a vector for cloning and rapid chemical sequencing of DNA. *Nucleic Acids Res* 9:4087-4098
203. Rüsse I, Sinowatz F (1991) Frühgravidität, Implantation und Plazentation. In: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey, Berlin, pp 153-220
204. Sage EH (1997) Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *CELL BIOLOGY* 7:
205. Sandoval C, Fisher PJ, Schlafer DH (2001) Characterization of trophoblast cell populations by lectin histochemistry in canine placenta during development. *J Reprod Fertil Suppl* 57:199-206
206. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M (1996) Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 7:213-221
207. Scheidegger P, Weiglhofer W, Suarez S, Kaser-Hotz B, Steiner R, Ballmer-Hofer K, Jaussi R (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. *Biol Chem* 380:1449-1454
208. Schnorr B (1996) Plazentation beim Säuger und Embryonalhüllen beim Vogel. In: *Embryologie der Haustiere: ein Kurzlehrbuch*. Enke, Stuttgart, pp 66-99
209. Schrimpf G (2002) Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, pp 147-168
210. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:983-985
211. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376:62-66
212. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA (1996) The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 271:3877-3883

213. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS (1997) Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 18:657-665
214. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:768-772
215. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, Levy BI (2003) Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 93:114-123
216. Smith SK (2001) Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 12:147-151
217. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745
218. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM (2001) Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 32:567-575
219. Strahl H (1906) Die Embryonalhüllen der Säugetiere und die Placenta. In: Hertwigs Handbuch der Vergleichenden und Experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Fischer, Jena,
220. Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H (2002) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 123:379-387
221. Sun TT, Shih C, Green H (1979) Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:2813-2817
222. Takahashi T, Shibuya M (1997) The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 14:2079-2089
223. Taniguchi Y, Morita I, Kubota T, Murota S, Aso T (2001) Human uterine myometrial smooth muscle cell proliferation and vascular endothelial growth-factor production in response to platelet-derived growth factor. *J Endocrinol* 169:79-86
224. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266:11947-11954
225. Torry DS, Hinrichs M, Torry RJ (2004) Determinants of placental vascularity. *Am J Reprod Immunol* 51:257-268
226. Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 95:1798-1807

227. Usborne AL, Bolton IB, Slukvin I (2002) Stromal decidualization of endometriosis in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*): a case report. *Comp Med* 52:167-170
228. Vonnahme KA, Ford SP (2004) Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *J Physiol* 554:194-201
229. Vuorela P, Carpen O, Tulppala M, Halmesmaki E (2000) VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 6:276-282
230. Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E (1997) Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 56:489-494
231. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269:26988-26995
232. Walter I, Schonkypl S (2006) Extracellular matrix components and matrix degrading enzymes in the feline placenta during gestation. *Placenta* 27:291-306
233. Wang H, Li Q, Lin H, Yu X, Qian D, Dai J, Duan E, Zhu C (2003) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) endometrium and placenta during early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 65:123-131
234. Watanabe A, Yasumizu T, Hoshi K, Katoh R, Kawaoi A, Shibuya M (1998) Vascular endothelial growth factor expression in the rat uterus and placenta throughout pregnancy. *Acta Histochem Cytochem* 31:419-426
235. Wei P, Chen XL, Song XX, Han CS, Liu YX (2004a) VEGF, bFGF, and their receptors in the endometrium of rhesus monkey during menstrual cycle and early pregnancy. *Mol Reprod Dev* 68:456-462
236. Wei P, Yu FQ, Chen XL, Tao SX, Han CS, Liu YX (2004b) VEGF, bFGF and their receptors at the fetal-maternal interface of the rhesus monkey. *Placenta* 25:184-196
237. Weston GC, Haviv I, Rogers PA (2002) Microarray analysis of VEGF-responsive genes in myometrial endothelial cells. *Mol Hum Reprod* 8:855-863
238. Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 91:695-704
239. Winther H, Ahmed A, Dantzer V (1999a) Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta* 20:35-43
240. Winther H, Dantzer V (2001) Co-localization of vascular endothelial growth factor and its two receptors flt-1 and kdr in the mink placenta. *Placenta* 22:457-465
241. Winther H, Leiser R, Pfarrer C, Dantzer V (1999b) Localization of micro- and intermediate filaments in non-pregnant uterus and placenta of the mink suggests

- involvement of maternal endothelial cells and periendothelial cells in blood flow regulation. *Anat Embryol (Berl)* 200:253-263
242. Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM (2003) Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction* 126:569-577
 243. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM (2002) Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 66:802-812
 244. Wynn RM, Corbett JR (1969) Ultrastructure of the canine placenta and amnion. *Am J Obstet Gynecol* 103:878-887
 245. Xu G, Guimond MJ, Chakraborty C, Lala PK (2002) Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidual product. *Biol Reprod* 67:681-689
 246. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J (1993) flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118:489-498
 247. Yi XJ, Jiang HY, Lee KK, WS O, Tang PL, Chow PH (1999) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors during embryonic implantation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell Tissue Res* 296:339-349
 248. Zhang EG, Burton GJ, Smith SK, Charnock-Jones DS (2002) Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: changes in diameter and perivascular cell coverage. *Placenta* 23:751-762
 249. Zuckermann FA, Head JR (1986) Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. *Placenta* 7:349-364
 250. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1:S10-S18

8 Anhang

8.1 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen für die Immunhistochemie nach der ABC-Methode

Blockpuffer

1,5 g BSA (= 1,5 %)

30 µl Triton® X-100 (= 0,3 %)

ad 100 ml PBS

PBS Stammlösung

41 g NaCl

11 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

2,75 g KH₂PO₄

pH 7,3

ad 1000 ml Aqua dest.

PBS Arbeitslösung

200 ml PBS Stammlösung

ad 1000 ml Aqua dest.

0,3 % H₂O₂

0,5 ml H₂O₂

ad 50 ml eiskaltes Methanol (100 %)

Proteinase K

10 mg Proteinase K

100 µl 0,5 M EDTA-Lösung

900 µl PBSM-Puffer, 1x

Von dieser Stammlösung (10 g Proteinase K/µl) wird für die Gebrauchslösung (20 µg/ml) je 4 µl aliquotiert und kurz vor Gebrauch auf 2 ml mit PBS-Puffer aufgefüllt.

Zitratpuffer

Lösung A (0,1 M Zitronensäure)

- 21,01 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$
- ad 1000 ml Aqua dest.

Lösung B (0,1 M Natriumcitrat)

- 29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H$
- ad 1000ml Aqua dest.

Ansatz Gebrauchslösung:

- a) 270 ml Aqua dest.
- b) 25 ml Stammlösung B
- c) ca. 5 ml Stammlösung A

→ a) und b) zusammengeben und mit Stammlösung A auf pH-Wert 6,0 einstellen.

Lösungen für die Immunhistochemie nach der APAAP-Methode

Stammlösung Tris-HCl

121,1 g Tris-HCl

pH 7,6

ad 1000 ml Aqua bidest.

Arbeitslösung Tris-HCl

100 ml Stammlösung Tris-HCl

8,5 g NaCl

1 ml Triton® X-100

ad 1000 ml Aqua dest.

20%ige Essigsäure

160 ml DEPC-Wasser

40 ml Eisessig

Blockpuffer

1 % BSA in Tris (1 g BSA + 70 ml Tris)

Lösungen für den Western Blot

Blotpuffer

1x TG

20 % (v/v) Ethanol

0,05 % SDS

Boehringer Lysepuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

40 mM NaF

5 mM EDTA

5 mM EGTA

1 % (v/v) Nonidet

0,1 % (w/v) Natriumdesoxycholat

0,1 % (w/v) SDS

1 mM PMSF

Coomassie Destain

30 % Methanol

10 % Essigsäure

Ponceau S-Lösung

0,2 % (w/v) Ponceau S

1 % Essigsäure

SDS-Page Puffer

1x TG

0,1 % (w/v) SDS

TBS (T)

25 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

(0,05 % (v/v) Tween 20)

TG

25 mM Tris

192 mM Glyzine

Lösungen für die PCR

5x Blue Run-Puffer

1,66 ml 1M Tris-HCl

9,43 ml 0,5 M EDTA

15,63 ml Glycerin

0,03 g Bromphenolblau

ad 62,5 ml Aqua bidest.

Lösungen für die ISH

Denhardt´s Reagenz

200 mg BSA

200 mg Ficoll 400

200 mg Polyvinylpyrrolidon

ad 10 ml DEPC-Wasser

DEPC-Wasser

1 ml Diethylpyrocarbonat

ad 1000 ml Aqua dest.

Gut schütteln, über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren.

50%iges Dextransulfat

5 g Dextransulfat

ad 10 ml DEPC-Wasser

0,5 M EDTA

8 g NaOH-Plättchen

74,4 g EDTA

ad 400 ml DEPC-Wasser

pH-Wert auf 8,0 einstellen.

20%ige Essigsäure

40 ml Eisessig

160 ml DEPC-Wasser

Formamid in feuchter Kammer

100 ml Formamid

20 ml SSC-Puffer, 20x

80 ml DEPC-Wasser

0,2%ige Glyzin-Lösung

100 ml PBSM-Puffer, 1x

200 mg Glyzin

0,2n HCl

5,2 ml 25 % HCl

200 ml DEPC-Wasser

LB-Medium

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1000 ml Aqua dest.

pH-Wert auf 7,0 mit NaOH einstellen, anschließend autoklavieren. Danach Zugabe von 15 g Agar.

1 M Levamisol

2,4 g Levamisol

10 ml NTB-Puffer, 1x

1 M MgCl₂-Lösung

81,4 g MgCl₂

ad 400 ml DEPC-Wasser

5x NTB-Puffer

60,5 g Tris-HCl

29,2 g NaCl

ad 1000 ml Aqua dest.

pH-Wert auf 9,6 einstellen, 1 ml DEPC-Wasser zufügen, gut schütteln, über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren.

4%ige Paraformaldehydlösung

20 g Paraformaldehyd

500 ml PBSM-Puffer, 1x

Zum Lösen auf 60°C erwärmen. 4 N NaOH zugeben, bis Lösung klar wird. pH-Wert auf 7,0 einstellen.

PBSM-Puffer

1 PBS-Tablette

400 ml DEPC-Wasser

1 ml MgCl₂

Proteinase K

10 mg Proteinase K

100 µl 0,5 M EDTA-Lösung

900 µl PBSM-Puffer, 1x

Von dieser Stammlösung (10 g Proteinase K/µl) wird für die Gebrauchslösung (20 µg/ml) je 4 µl aliquotiert und kurz vor Gebrauch auf 2 ml mit PBS-Puffer aufgefüllt.

10x TAE-Puffer

48,4 g Tris

11,4 ml Essigsäure

20 ml 0,5 M EDTA

ad 1000 ml Aqua bidest.

pH-Wert auf 8,4 einstellen

1x TAE-Puffer

Die Stammlösung 10x TAE mit Aqua bidest. zehnfach verdünnen.

1 M TBS-Puffer

121,14 g Tris

ad 1000 ml Aqua dest.

Mit HCl auf pH-Wert 7,6 einstellen.

0,1 M TBS-Puffer

100ml 1 M TBS-Puffer

8,5 g NaCl

1 ml Triton® X-100

ad 1000 ml Aqua dest.

10x TNMT-Puffer

121,1 g Tris-HCl

58,4 g NaCl

4,17 g MgCl₂

ad 1000 ml Aqua dest.

pH-Wert auf 7,5 einstellen, 1 ml DEPC-Wasser zufügen, gut schütteln, über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren, nach dem Erkalten 5 ml Triton® X-100 zugeben.

1x TNMT-Puffer

Die Stammlösung 10x TNMT mit Aqua dest. zehnfach verdünnen.

20x SSC-Puffer

88,23 g Natriumzitat

175,29 g NaCl

ad 1000 ml Aqua dest.

pH-Wert auf 7,0 einstellen, 1 ml DEPC-Wasser zufügen, gut schütteln, über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren.

Die jeweiligen SSC-Verdünnungen mit DEPC-Wasser herstellen.

8.2 Verwendete Stoffe und Reagenzien

- ABC-Elite Kit Standard; Vector Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, England)
- Agarose High Resolution (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- APAAP, Mouse, Monoclonal (DakoCytomation GmbH, D-Hamburg)
- BCA Protein Assay Reagent Lösung A und B (Pierce, Illinois, USA)
- Biotinylated Anti-Mouse/Anti-Rabbit IgG(H+L) Affinity Purified (Vector Laboratories, USA-Burlingame)
- Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Bromphenolblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- BSA (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- $C_6H_5O_7Na_3$ (tri-Natriumcitrat-Dihydrat) (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (Citronensäure-1-hydrat) (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- DEPC (Diethylpyrocarbonat) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Dextransulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- DIG-RNA-Labeling Mix (Roche Diagnostics, D-Mannheim)
- DNA-Ladder, 50 bp (peqlab Biotechnologie GmbH, D-Erlangen)
- DNase I, RNase-frei (Roche Molecular Biochemicals, D-Mannheim)
- DNTP-Mix 10mM (desoxy-Nukleotid Triphosphat) (Promega GmbH, D-Mannheim)
- E. coli (XL-1 Blue) (Stratagene Europe, Holland)
- EDTA (Ethylenediamine-tetraaceticacid) (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- EGTA (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Essigsäure (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Ethanol vergällt (Schmitt, D-Dillenburg)
- Ethanol rein (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Ficoll 400 (Serva, D-Heidelberg)
- Formaldehyd (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Formalin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Fuchsin + Substrate-Chromogen System (DakoCytomation GmbH, D-Hamburg)
- Gelatine: Kaisers Glyceringelatine (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Gene Amp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems GmbH, D-Darmstadt)

- Glycerin Rotipuran® = Glycerol (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- Glycine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Go Taq® Flexi DNA-Polymerase Kit (Promega GmbH, D-Mannheim)
- Guanidinhydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Hämatoxillin (Shandon, USA-Pittsburgh)
- HCl konz. (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Hefe-tRNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- ImmPRESS® anti-Mouse Ig Kit (LINARIS, D-Wertheim-Bettingen)
- IPTG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Isopropanol (Isopropylalkohol) (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- KH_2PO_4 , Kaliumdihydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- LB-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- LB-Medium-Agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Levamisol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Methanol (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- MgCl_2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- MnCl_2 (Manganese chloride) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Monoclonal Mouse Anti-Rabbit Ig (DakoCytomation GmbH, D-Hamburg)
- NBT/BCIP: nitroblue tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (KPL, D-Wedel)
- NaCl (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- NaF (AppliChem, BioChemica, D-Darmstadt)
- Na_2HPO_4 , di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- NaOH konz. (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- NaOH-Plättchen (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- Natriumdesoxycholat (AppliChem, BioChemica, D-Darmstadt)
- Natriumzitrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Nonidet P40 (AppliChem, BioChemica, D-Darmstadt)
- Normal horse serum (Vector Laboratories, USA-Burglingame)
- Oligo-dT-Primer (Promega GmbH, D-Mannheim)
- Paraffin, Gewebereinbettmedium pro Wax 56°C (proLab GmbH, D-Lollar)
- Paraformaldehyd (Fluka, D-Neu-Ulm)
- PBS-Tablette (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)

- PCR-Puffer 10x (Qiagen GmbH, D-Hilden)
- Peroxidase Substrate Kit AEC (Vector Laboratories, Burlingame, England)
- Peroxidase-Substratkit DAB (BioPrime, BioLogo, D-Kronshagen)
- pGEM®-T Vektor (pGEM®-T Vektor System I, Promega GmbH, D-Mannheim)
- PMSF (AppliChem, BioChemica, D-Darmstadt)
- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Ig (DakoCytomation GmbH, D-Hamburg)
- Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Ponceau S (AppliChem, BioChemica, D-Darmstadt)
- Primerpaare (MWG Biotech GmbH, D-Ebersberg)
- Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen GmbH, D-Hilden)
- QIAprep® Miniprep-Kit (Qiagen GmbH, D-Hilden)
- Q-Solution (Qiagen GmbH, D-Hilden)
- Restriktionsenzyme (Nco-I, Not-I) (New England Biolabs, D-Frankfurt)
- RNase-AWAY® Reagent (Invitrogen, D-Karlsruhe)
- RNAlater® (Ambion Biotechnologie GmbH, D-Wiesbaden)
- RNase Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Salmon-Sperm DNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Schaf-Anti-Digoxigenin Fab Fragmente (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- SDS (AppliChem, BioChemica, D-Darmstadt)
- SYBR® Green I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- T7-RNA-Polymerase, Sp6-RNA-Polymerase (Promega, D-Mannheim)
- TaqMan® qPCR MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- Tris HCl pH 7,4 (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- Triton® X-100 (Calbiochem, EMD Biosciences, Merck KGaA, D-Darmstadt)
- TRIzol®-Reagent (Life Technologies, D-Karlsruhe)
- Tween® 20, Polyoxyethylensorbitan Monolaurate (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- Wasserstoffperoxid (Merck KGaA, D-Darmstadt)
- X-Gal (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Taufkirchen)
- Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- Zitronensäure-1-hydrat zur Analyse (Merck KGaA, D-Darmstadt)

8.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

- 96-well optical plates (Applied Biosystems, D-Darmstadt)
- Aufblock-Gerät, Leica EG 1160 (Leica Instruments GmbH, D-Nussloch)
- Autoklav (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Bio-Photometer (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-Hamburg)
- Brutschrank (Mettler, D-Schwabach)
- Deckgläser (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- Einbettter, Leica TP 1050 (Leica Instruments GmbH, D-Nussloch)
- Einmalküvetten (Eppendorf UVetten®) (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-Hamburg)
- Elektrophoreseapparatur Mini-Protean 3® Elektrophoresis Cell-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München)
- Elektrophoresis Hood mit 0,8 Vergrößerung (Polaroid, GmbH, D-Offenbach)
- Entwässerungsgerät Leica TP 1050 (Leica, D-Bensheim)
- Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Feuchte Kammer (DakoCytomation GmbH, D-Hamburg)
- Gelkammern Agal Mini/Maxi (Whatman Biometra GmbH i.L., D-Göttingen)
- Gewebeeinbettmedium proWax (Paraffin) (proLab GmbH, D-Lollar)
- Glasküvetten, Färbekästen nach Hellendahl (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Heizplatte (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, D-Staufen i. Br.)
- High Performance Ultraviolett Transilluminator (Fa UVP, Upland, CA)
- Kamera CC 12 (Soft Imaging System GmbH, D-Münster)
- Lichtmikroskop Leica DM LB (Leica, D-Wetzlar)
- NuPage® 20 x Mops SDS Running buffer (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® 20 x Transferbuffer (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® 20 x Tris-Actetat Running buffer (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® Antioxidant (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® LDS Sample Buffer 4x (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® Nitrocellulosemembran (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® Novex Bis Tris Gel 12% (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)

- NuPage® Novex Tris Acetat Gel 3-8% (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® Reducing Agent 10x (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® Sponge Pads (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® X Cell Sure Lock™ Mini-Cell (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- NuPage® X Cell II™ Blot Module (Invitrogen GmbH, D-Karlsruhe)
- Küvette UVette® 220-1600 nm (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Mikrotom Microm (Microm GmbH, Type HM 400 R, D-Walldorf)
- PAP PEN, Immunostaining Pen extra dick (Fa. G. Kisker GbR, D-Steinfurt)
- Paraffinaufgießstation, EG 1160 (Leica, D-Bensheim)
- PCR-Tubes (Axygen Scientific Inc., Union Citi, USA)
- pH-Meter WTW inoLab pH 720 (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Photomikroskop Axiophot (Carl Zeiss AG, D-Oberkochen)
- Pinzetten (Ratiolab GmbH, D-Dreieich)
- Pipetten (Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe)
- Pipettenspitzen (Ratiolab GmbH, D-Dreieich)
- Pipettenspitzen gestopft (Biozym Diagnostik GmbH, D-Oldendorf)
- Polaroid-Sofortbildfilm High Speed, Typ 667 (Polaroid GmbH, D-Offenbach)
- Porzellanschalen (Ratiolab GmbH, D-Dreieich)
- Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA)
- Rüttler: IKA®-Schüttler MTS 2 (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, D-Staufen i. Br.)
- Scanner HP Scanjet G4050 (Avitos GmbH, D-Linden)
- Software analySIS®, digitale Bildanalyse (Soft Imaging System GmbH, D-Münster)
- Statistical Software GraphPad3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA)
- Stromgeber Elektrophoresekammer PowerPac 200 Power Supply (Bio-Rad Laboratories GmbH, D-München)
- SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, D-Teningen)
- T3 Thermocycler (Whatman Biometra GmbH i.L., D-Göttingen)
- Trockenschrank, Memmert (MAGV GmbH, D-Rabenau-Londorf)
- Ultra-Turrax® T8 mit Dispergierwerkzeug S8 N 5-G (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, D-Staufen i. Br.)
- Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat (TP1050, Leica, D-Bensheim)

- Vortexer VF 2 (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, D-Staufen i. Br.)
- Waage PB3002-5 DeltaRange® (Mettler Toledo, Schweiz)
- Wasserbad (Memmert, D-Schwabach)
- Zentrifuge Typ 1110 Mikro 22R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, D-Tuttlingen)

8.4 Veröffentlichte Abstracts

Bezler L., Zeiler M., Ambrosio C., Leiser R., Pfarrer C. (2006). Localization of cytoskeletal filaments in the endotheliochorial placenta of dog and cat from early gestation until term. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 41, Suppl. 1, A.18.

Bezler L., Zeiler M., Leiser R., Tinneberg H.-R., Pfarrer C. (2006). Characterization of the placental cytoskeleton of the dog. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. Vol. 111, Suppl.1: 202.

Bezler L., Zeiler M., Leiser R., Tinneberg H.-R., Pfarrer C. (2006). Localization of micro- and intermediate filaments in the endotheliochorial placenta of the dog. The 12th International Federation of Placenta Associations Meeting, Kobe, Japan, 6.-9.09.2006. Abstract book, 74.

Pfarrer C., Bezler L., Kowalewski M.P., Leiser R., Hoffmann B., Dantzer, V. (2007). Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the canine placenta. Abstract for the Forthcoming International Federation of Placenta Associations Meetings in Kingston, Ontario, Canada. *Placenta* 28: A.1-A.78, A1.12.

8.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christiane Pfarrer für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die freundliche Unterstützung und Beratung. Vielen Dank für die engagierte und freundschaftliche Hilfestellung und Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit!

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Leiser danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie und dafür, dass seine Tür bei fachlichen Fragen immer offen stand.

Der H. Wilhelm Schaumann Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, vor allem Frau Kathrin Wolf, Frau Sigrid Kettner und Frau Susanne Schubert-Porth, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung.

Bei Dr. Nina Hambruch und Philip Bridger möchte ich mich herzlich für die Hilfe bei Western Blot Fragen bedanken.

Den Mitarbeitern des „Forschungslabors Pfarrer“ danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mariusz Kowalewski danke ich für die Einführung und jederzeit angebotene Hilfe in der Real Time RT-PCR sowie für das zur Verfügung stellen der Primer und TaqMan-Sonden.

Vanessa Klippel danke ich für die unterhaltsamen und abwechslungsreichen Stunden unserer gemeinsamen Doktorandenzeit in Zimmer 102b.

Martina Zeiler danke ich ganz besonders dafür, dass sie für alle Fragen in jeglicher Hinsicht immer ein offenes Ohr für mich hatte und immer für mich da war.

Der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen, der Tierärztlichen Praxis Dr. med. vet. U. Linzer in Koblenz und der Clinica Veterinària S.M. in Faro, Portugal danke ich für die Bereitstellung und Entnahmemöglichkeiten von Probenmaterial. Der Universität von São Paulo, Brasilien danke ich für die Übersendung einiger in Paraffin eingebetteter Gewebeproben.

Herrn Prof. Dr. Bülte und den Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungskunde danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der quantitativen Real Time RT-PCR.

Christina Rüttinger, Kerstin Lahnstein, Carolin Knorr, Susan Bandilla, Anja Schäfer und Peter Richterich danke ich für die schöne gemeinsame Zeit des Studiums und die gemeinsam „durchlittene“ Doktorandenzeit. Ohne eure Freundschaft, euren Beistand und eure jederzeitige Hilfsbereitschaft wäre dieses Studium sicher nicht das gewesen, was wir daraus gemacht haben. Danke!

Jochen danke ich für seine Geduld und sein Verständnis sowie für all die kleinen und großen Hilfen während meiner Doktorandenzeit.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, deren Vertrauen, uneingeschränkte Unterstützung und Zuspruch mir die Möglichkeit gaben, diese Arbeit und das Studium erfolgreich durchzuführen. Vor allem danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Susen dafür, dass sie zu jeder Zeit und bei jedwedem Problem für mich da waren und liebevoll unterstützten. Vielen Dank!

8.6 Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5266-8



9 1783835 1952669